(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2021-521884
(P2021-521884A)
(43)公表日　令和3年8月30日(2021.8.30)

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
C12N	***15/09***	***(2006.01)***	C12N	15/09	110	4B065
C07K	*14/705*	*(2006.01)*	C07K	14/705	ZNA	4H045
C07K	*14/145*	*(2006.01)*	C07K	14/145		
C07K	*14/645*	*(2006.01)*	C07K	14/645		
C07K	*14/79*	*(2006.01)*	C07K	14/79		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 130 頁）　最終頁に続く

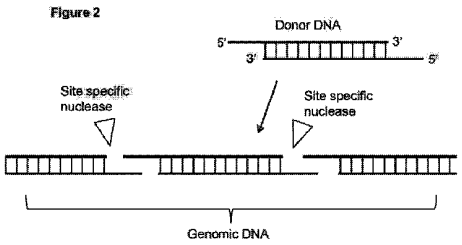
(21)出願番号　特願2021-506370 (P2021-506370)
(86)(22)出願日　平成31年4月17日 (2019.4.17)
(85)翻訳文提出日　令和2年12月21日 (2020.12.21)
(86)国際出願番号　PCT/US2019/028004
(87)国際公開番号　WO2019/204531
(87)国際公開日　令和1年10月24日 (2019.10.24)
(31)優先権主張番号　62/659,627
(32)優先日　平成30年4月18日 (2018.4.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)
(31)優先権主張番号　62/685,243
(32)優先日　平成30年6月14日 (2018.6.14)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(71)出願人　520407622
リガンダル・インコーポレイテッド
アメリカ合衆国、カリフォルニア州　９４１０７、サンフランシスコ、フィフス・ストリート　６５０、スイート　３１１
(74)代理人　100108855
弁理士　蔵田　昌俊
(74)代理人　100103034
弁理士　野河　信久
(74)代理人　100179062
弁理士　井上　正
(74)代理人　100199565
弁理士　飯野　茂
(74)代理人　100219542
弁理士　大宅　郁治

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ゲノム編集方法及び組成物

(57)【要約】
粘着末端を使用するゲノム編集方法及び組成物を提供する。本発明の方法は、（ａ）標的細胞のゲノムＤＮＡ内の２か所の各々で付着型切断を生成し、これにより、２つのゲノム付着末端を生じさせること；及び（ｂ）ドナーＤＮＡの粘着末端がゲノムＤＮＡの粘着末端とハイブリダイズし、ドナーＤＮＡがゲノムに挿入されるように、ゲノムＤＮＡの粘着末端に合致／対応する付着末端（すなわち、粘着末端）を有する直鎖状の二本鎖ドナーＤＮＡを用意し／導入することを含む。ある態様では、付着型切断は、標的細胞に１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼ（又は１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼをコードする１つ以上の核酸）を導入することにより生成する。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
標的細胞のゲノム編集方法であって、
（ａ）前記標的細胞のゲノム内の２か所で付着末端を伴う二本鎖切断を生成する工程、これにより、第１のゲノム付着末端及び第２のゲノム付着末端を生じ；並びに
（ｂ）前記標的細胞に、各末端に５’突出又は３’突出を有する直鎖状の二本鎖ドナーＤＮＡを導入する工程
を含み、
前記ドナーＤＮＡの１つの末端が前記第１のゲノム付着末端とハイブリダイズし、前記ドナーＤＮＡの他の末端が前記第２のゲノム付着末端とハイブリダイズし、これにより、前記直鎖状の二本鎖ドナーＤＮＡが前記標的細胞のゲノムに挿入される、
方法。
【請求項２】
前記ドナーＤＮＡの少なくとも１つの末端が５’突出を有し、前記ゲノム付着末端のうちの少なくとも１つが５’突出を有する、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記ドナーＤＮＡの少なくとも１つの末端が３’突出を有し、前記ゲノム付着末端のうちの少なくとも１つが３’突出を有する、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
前記生成する工程が、１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼ又は前記１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼをコードする１つ以上の核酸を、前記標的細胞に導入し、前記二本鎖切断を生成することを含む、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
前記１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼが、メガヌクレアーゼ、ホーミングエンドヌクレアーゼ、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）及び転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）のうちの少なくとも１つを含む、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
前記１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼが、付着末端切断性ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエフェクタータンパク質を含む、請求項４に記載の方法。
【請求項７】
前記生成する工程が、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓガイド核酸又は前記ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓガイド核酸をコードする核酸を、前記細胞に導入することをさらに含む、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記方法が、（ｉ）前記１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼ又は前記１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼをコードする１つ以上の核酸、及び（ｉｉ）前記直鎖状の二本鎖ドナーＤＮＡを、前記細胞に、同じ送達媒体のペイロードとして導入することを含む、請求項４～７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
前記細胞に、前記１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼ及び前記直鎖状の二本鎖ドナーＤＮＡを、デオキシリボヌクレオタンパク質複合体又はリボ－デオキシリボヌクレオタンパク質複合体として導入する、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
前記導入することにおいて、前記ドナーＤＮＡの末端を、前記１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼに部位特異的に結合させる、請求項８又は９に記載の方法。
【請求項１１】
前記送達媒体が非ウイルス性である、請求項８～１０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２】
前記送達媒体がナノ粒子である、請求項８～１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】

（ｉ）及び（ｉｉ）に加えて、前記ナノ粒子が、アニオン性ポリマー組成物、カチオン性ポリマー組成物及びカチオン性ポリペプチド組成物を含むコアを含む、請求項１２に記載の方法。

【請求項１４】

前記アニオン性ポリマー組成物が、ポリ（グルタミン酸）及びポリ（アスパラギン酸）から選択されるアニオン性ポリマーを含む、請求項１３に記載の方法。

【請求項１５】

前記カチオン性ポリマー組成物が、ポリ（アルギニン）、ポリ（リシン）、ポリ（ヒスチジン）、ポリ（オルニチン）及びポリ（シトルリン）から選択されるカチオン性ポリマーを含む、請求項１３又は１４に記載の方法。

【請求項１６】

ナノ粒子が前記コアを封入する脱落層をさらに含む、請求項１３～１５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１７】

前記脱落層がアニオン性コート又はカチオン性コートである、請求項１６に記載の方法。

【請求項１８】

前記脱落層が、シリカ、ペプトイド、ポリシステイン、カルシウム、酸化カルシウム、ヒドロキシアパタイト、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、マンガン、酸化マンガン、リン酸マンガン、硫酸マンガン、マグネシウム、酸化マグネシウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、鉄、酸化鉄、リン酸鉄及び硫酸鉄のうちの１つ又は複数を含む、請求項１６又は１７に記載の方法。

【請求項１９】

前記ナノ粒子が前記脱落層を取り囲む表面コートをさらに含む、請求項１６～１８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２０】

前記表面コートが、前記脱落層と静電相互作用するカチオン性又はアニオン性のアンカードメインを含む、請求項１９に記載の方法。

【請求項２１】

前記表面コートが１つ以上のターゲティングリガンドを含む、請求項１９又は２０に記載の方法。

【請求項２２】

前記表面コートが、狂犬病ウイルス糖タンパク質（ＲＶＧ）断片、ＡｐｏＥ－トランスフェリン、ラクトフェリン、メラノフェリチン、オボトランスフェリチン、L-セレクチン、E-セレクチン、P-セレクチン、シアル化ペプチド、ポリシアル化Ｏ結合型ペプチド、ＴＰＯ、ＥＰＯ、ＰＳＧＬ－１、ＥＳＬ－１、ＣＤ４４、死受容体３（ＤＲ３）、ＬＡＭＰ１、ＬＡＭＰ２、Ｍａｃ２－ＢＰ、幹細胞因子（ＳＣＦ）、ＣＤ７０、ＳＨ２ドメイン含有タンパク質１Ａ（ＳＨ２Ｄ１Ａ）、エキセンディン、エキセンディン－Ｓ１１Ｃ、ＧＬＰ１、ＲＧＤ、トランスフェリンリガンド、ＦＧＦ断片、α５β１リガンド、ＩＬ２、Ｃｄｅ３ε、ペプチド－ＨＬＡ－Ａ＊２４０２、ＣＤ８０、ＣＤ８６、コハク酸、ビスホスホネート、造血幹細胞走化性脂質、スフィンゴシン、セラミド、スフィンゴシン-1-リン酸、セラミド-1-リン酸、及びこれらの活性ターゲティング断片からなる群から選択される１つ以上のターゲティングリガンドを含む、請求項１９又は２０に記載の方法。

【請求項２３】

前記表面コートが、ＣＤ３、ＣＤ８、ＣＤ４、ＣＤ２８、ＣＤ９０、ＣＤ４５ｆ、ＣＤ３４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ；ＴＣＲα、ＴＣＲβ、ＴＣＲγ、及び／又はＴＣＲδの定常領域；４－１ＢＢ、ＯＸ４０、ＯＸ４０Ｌ、ＣＤ６２Ｌ、ＡＲＰ５、ＣＣＲ５、ＣＣＲ７、ＣＣＲ１０、ＣＸＣＲ３、ＣＸＣＲ４、ＣＤ９４／ＮＫＧ２、ＮＫＧ２Ａ、ＮＫＧ２Ｂ、ＮＫＧ２Ｃ、ＮＫＧ２Ｅ、ＮＫＧ２Ｈ、ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫＧ２Ｆ、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ４６、ＮＫｐ３０、ＤＮＡＭ、ＸＣＲ１、ＸＣＬ１、Ｘ

ＣＬ２、ＩＬＴ、ＬＩＲ、Ｌｙ４９、ＩＬ２Ｒ、ＩＬ７Ｒ、ＩＬ１０Ｒ、ＩＬ１２Ｒ、ＩＬ１５Ｒ、ＩＬ１８Ｒ、ＴＮＦα、ＩＦＮγ、ＴＧＦ－β、及びα５β１から選択される標的に対する結合を提供する１つ以上のターゲティングリガンドを含む、請求項１９又は２０に記載の方法。

【請求項２４】

前記表面コートが、骨髄細胞、造血幹細胞（ＨＳＣ）、造血幹／前駆細胞（ＨＳＰＣ）、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）、骨髄系前駆細胞、リンパ系前駆細胞、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫＴ細胞、ＮＫ細胞、樹状細胞、単球、顆粒球、赤血球、巨核細胞、マスト細胞、好塩基球、好酸球、好中球、マクロファージ、赤血球系前駆細胞、巨核細胞－赤血球系前駆細胞（ＭＥＰ）、骨髄系共通前駆細胞（ＣＭＰ）、複能性前駆細胞（ＭＰＰ）、造血幹細胞（ＨＳＣ）、短期ＨＳＣ（ＳＴ－ＨＳＣ）、ＩＴ－ＨＳＣ、長期ＨＳＣ（ＬＴ－ＨＳＣ）、内皮細胞、ニューロン、星状細胞、膵細胞、膵島β細胞、肝臓細胞、筋肉細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、肝細胞、脂肪細胞、腸細胞、結腸細胞、及び胃細胞から選択される標的細胞に対する結合を提供する１つ以上のターゲティングリガンドを含む、請求項１９又は２０に記載の方法。

【請求項２５】

前記送達媒体が前記ペイロードとコンジュゲートしたターゲティングリガンドで、前記ターゲティングリガンドが細胞表面タンパク質に対する結合を提供する、請求項８～１０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２６】

前記送達媒体が帯電ポリマーであるポリペプチドドメインとコンジュゲートしたターゲティングリガンドで、前記ターゲティングリガンドが細胞表面タンパク質に対する結合を提供し、帯電ポリマーであるポリペプチドドメインが、核酸ペイロードと共に凝縮され、及び／又はタンパク質ペイロードと静電相互作用する、請求項８～１０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２７】

前記ターゲティングリガンドが、ペプチド、ＳｃＦｖ、Ｆ（ａｂ）、核酸アプタマー又はペプトイドである、請求項２５又は２６に記載の方法。

【請求項２８】

前記帯電ポリマーであるポリペプチドドメインのアミノ酸長が３～３０である、請求項２６に記載の方法。

【請求項２９】

前記送達媒体が、前記ペイロード及び前記帯電ポリマーであるポリペプチドドメインと相互作用する、アニオン性ポリマーをさらに含む、請求項２６～２８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３０】

前記アニオン性ポリマーが、ポリ（グルタミン酸）及びポリ（アスパラギン酸）から選択される、請求項２９に記載の方法。

【請求項３１】

前記ターゲティングリガンドのアミノ酸長が５～５０である、請求項２５～３０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３２】

前記ターゲティングリガンドが、Ｇタンパク質共役型受容体（ＧＰＣＲ）ファミリーＢ、受容体チロシンキナーゼ（ＲＴＫ）、細胞表面糖タンパク質及び細胞間接着分子から選択される細胞表面タンパク質に対する結合を提供する、請求項２５～３１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３３】

前記ターゲティングリガンドが、狂犬病ウイルス糖タンパク質（ＲＶＧ）断片、ＡｐｏＥ－トランスフェリン、ラクトフェリン、メラノフェリチン、オボトランスフェリチン、L-セレクチン、E-セレクチン、P-セレクチン、シアル化ペプチド、ポリシアル化Ｏ結合型

ペプチド、ＴＰＯ、ＥＰＯ、ＰＳＧＬ－１、ＥＳＬ－１、ＣＤ４４、死受容体３（ＤＲ３）、ＬＡＭＰ１、ＬＡＭＰ２、Ｍａｃ２－ＢＰ、幹細胞因子（ＳＣＦ）、ＣＤ７０、ＳＨ２ドメイン含有タンパク質１Ａ（ＳＨ２Ｄ１Ａ）、エキセンディン、エキセンディン－Ｓ１１Ｃ、ＧＬＰ１、ＲＧＤ、トランスフェリンリガンド、ＦＧＦ断片、α５β１リガンド、ＩＬ２、Ｃｄｅ３ε、ペプチド－ＨＬＡ－Ａ＊２４０２、ＣＤ８０、ＣＤ８６、コハク酸、ビスホスホネート、造血幹細胞走化性脂質、スフィンゴシン、セラミド、スフィンゴシン-1-リン酸、セラミド-1-リン酸、及びこれらの活性ターゲティング断片からなる群から選択される、請求項２５～３１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３４】

前記ターゲティングリガンドが、ＣＤ３、ＣＤ８、ＣＤ４、ＣＤ２８、ＣＤ９０、ＣＤ４５ｆ、ＣＤ３４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ；ＴＣＲα、ＴＣＲβ、ＴＣＲγ、及び／又はＴＣＲδの定常領域；４－１ＢＢ、ＯＸ４０、ＯＸ４０Ｌ、ＣＤ６２Ｌ、ＡＲＰ５、ＣＣＲ５、ＣＣＲ７、ＣＣＲ１０、ＣＸＣＲ３、ＣＸＣＲ４、ＣＤ９４／ＮＫＧ２、ＮＫＧ２Ａ、ＮＫＧ２Ｂ、ＮＫＧ２Ｃ、ＮＫＧ２Ｅ、ＮＫＧ２Ｈ、ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫＧ２Ｆ、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ４６、ＮＫｐ３０、ＤＮＡＭ、ＸＣＲ１、ＸＣＬ１、ＸＣＬ２、ＩＬＴ、ＬＩＲ、Ｌｙ４９、ＩＬ２Ｒ、ＩＬ７Ｒ、ＩＬ１０Ｒ、ＩＬ１２Ｒ、ＩＬ１５Ｒ、ＩＬ１８Ｒ、ＴＮＦα、ＩＦＮγ、ＴＧＦ－β、及びα５β１から選択される標的に対する結合を提供する、請求項２５～３１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３５】

前記ターゲティングリガンドが、骨髄細胞、造血幹細胞（ＨＳＣ）、長期ＨＳＣ、短期ＨＳＣ、造血幹／前駆細胞（ＨＳＰＣ）、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）、骨髄系前駆細胞、リンパ系前駆細胞、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫＴ細胞、ＮＫ細胞、樹状細胞、単球、顆粒球、赤血球、巨核細胞、マスト細胞、好塩基球、好酸球、好中球、マクロファージ、赤血球系前駆細胞（例．ＨＵＤＥＰ細胞）、巨核細胞－赤血球系前駆細胞（ＭＥＰ）、骨髄系共通前駆細胞（ＣＭＰ）、複能性前駆細胞（ＭＰＰ）、造血幹細胞（ＨＳＣ）、短期ＨＳＣ（ＳＴ－ＨＳＣ）、ＩＴ－ＨＳＣ、長期ＨＳＣ（ＬＴ－ＨＳＣ）、内皮細胞、ニューロン、星状細胞、膵細胞、膵島β細胞、筋肉細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、肝細胞、脂肪細胞、腸細胞、結腸細胞、及び胃細胞からなる群から選択される細胞への結合をもたらす、請求項２５～３１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３６】

前記標的細胞のゲノム内の前記２か所で二本鎖切断を生成する前の前記２か所の間隔が、１，０００，０００塩基対以下である、請求項１～３５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３７】

前記標的細胞のゲノム内の前記２か所で二本鎖切断を生成する前の前記２か所の間隔が、１００，０００塩基対以下である、請求項１～３５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３８】

前記第１及び第２のゲノム付着末端を、ＴＣＲα座位又はＴＣＲβ座位において生じさせる、請求項１～３５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３９】

前記第１及び第２のゲノム付着末端のうちの少なくとも１つを、（１）図５９に示されたＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）配列のうちの１以上を使用して、及び／又は（２）図５９に示されたＴＡＬＥＮ配列のうちの１以上をターゲティングすることにより生じさせる、請求項１～３５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４０】

前記ドナーＤＮＡが、合計１０塩基対（ｂｐ）～１００キロ塩基対（ｋｂｐ）である、請求項１～３５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４１】

前記ドナーＤＮＡの前記挿入が、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）タンパク質をコードするヌクレオチド配列内で生じる、請求項１～４０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４２】
前記ドナーＤＮＡが、前記ＴＣＲタンパク質のＣＤＲ１、ＣＤＲ２又はＣＤＲ３領域のアミノ酸をコードする、請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
前記ドナーＤＮＡが、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードするヌクレオチド配列を含み、前記ドナーＤＮＡの挿入が、前記ＣＡＲをコードする前記ヌクレオチド配列の内因性Ｔ細胞プロモーターへの作動可能な連結をもたらす、請求項１～４０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４４】
前記ドナーＤＮＡが、プロモーターに作動可能に連結し、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項１～４０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４５】
前記ドナーＤＮＡが、膜に結合し細胞外に提示される細胞特異的ターゲティングリガンドをコードするヌクレオチド配列を含み、前記ドナーＤＮＡの挿入が、前記細胞特異的ターゲティングリガンドをコードするヌクレオチド配列の内因性プロモーターへの作動可能な連結をもたらす、請求項１～４０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４６】
前記ドナーＤＮＡが、膜に結合し細胞外に提示される細胞特異的ターゲティングリガンドをコードする配列に作動可能に連結するプロモーターを含む、請求項１～４０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４７】
前記方法が、
前記標的細胞のゲノム内の４か所で付着末端を伴う二本鎖切断を生成し、これにより、前記第１及び第２のゲノム付着末端に加えて、第３のゲノム付着末端及び第４のゲノム付着末端を生じさせること；並びに
各々が、各末端に５’突出又は３’突出を有する２つの直鎖状の二本鎖ドナーＤＮＡを導入すること
を含み、
１つのドナーＤＮＡの末端が前記第１のゲノム付着末端及び第２のゲノム付着末端とハイブリダイズし、他のドナーＤＮＡの末端が前記第３のゲノム付着末端及び第４のゲノム付着末端とハイブリダイズし、
これにより、前記２つのドナーＤＮＡが前記標的細胞のゲノムに挿入される、請求項１～４０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４８】
（１）１つのドナーＤＮＡの挿入が、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α若しくはδサブユニットをコードするヌクレオチド配列内で生じ、他のドナーＤＮＡの挿入が、ＴＣＲβ若しくはγサブユニットをコードするヌクレオチド配列内で生じる；
（２）１つのドナーＤＮＡの挿入が、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α若しくはγサブユニットをコードするヌクレオチド配列内で生じ、他のドナーＤＮＡの挿入が、ＴＣＲβ若しくはδサブユニットをコードするヌクレオチド配列内で生じる；又は
（３）１つのドナーＤＮＡの挿入が、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ若しくはＩｇＭタンパク質のκ鎖をコードするヌクレオチド配列内で生じ、他のドナーＤＮＡの挿入が、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ若しくはＩｇＭタンパク質のλ鎖をコードするヌクレオチド配列内で生じる、
請求項４７に記載の方法。
【請求項４９】
１つのドナーＤＮＡの挿入が、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α又はδサブユニットの定常領域をコードするヌクレオチド配列内で生じ、他のドナーＤＮＡの挿入が、ＴＣＲβ又はγサブユニットの定常領域をコードするヌクレオチド配列内で生じる、請求項４７に記載の方法。

【請求項５０】
（１）１つのドナーＤＮＡの挿入が、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α若しくはδサブユニットのプロモーターとして機能するヌクレオチド配列内で生じ、他のドナーＤＮＡの挿入が、ＴＣＲβ若しくはγサブユニットのプロモーターとして機能するヌクレオチド配列内で生じる；
（２）１つのドナーＤＮＡの挿入が、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α若しくはγサブユニットのプロモーターとして機能するヌクレオチド配列内で生じ、他のドナーＤＮＡの挿入が、ＴＣＲβ若しくはδサブユニットのプロモーターとして機能するヌクレオチド配列内で生じる；又は
（３）１つのドナーＤＮＡの挿入が、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ若しくはＩｇＭタンパク質のκ鎖のプロモーターとして機能するヌクレオチド配列内で生じ、他のドナーＤＮＡの挿入が、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ若しくはＩｇＭタンパク質のλ鎖のプロモーターとして機能するヌクレオチド配列内で生じる、
請求項４７に記載の方法。
【請求項５１】
前記ドナーＤＮＡの挿入が、挿入されたドナーＤＮＡのＴ細胞受容体（ＴＣＲ）α、β、γ又はδの内因性プロモーターとの作動可能な連結をもたらす、請求項１～５０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５２】
前記ドナーＤＮＡが、ＴＣＲα、β、γ又はδのプロモーターに作動可能に連結するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項１～５０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５３】
前記ドナーＤＮＡの挿入が、挿入されたドナーＤＮＡの、（ｉ）Ｔ細胞特異的プロモーター；（ｉｉ）ＣＤ３プロモーター；（ｉｉｉ）ＣＤ２８プロモーター；（ｉｖ）幹細胞特異的プロモーター；（ｖ）体細胞特異的プロモーター；（ｖｉ）Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α、β、γ又はδのプロモーター；（ｖ）Ｂ細胞特異的プロモーター；（ｖｉ）ＣＤ１９プロモーター；（ｖｉｉ）ＣＤ２０プロモーター；（ｖｉｉｉ）ＣＤ２２プロモーター；（ｉｘ）Ｂ２９プロモーター；及び（ｘ）Ｔ細胞又はＢ細胞のＶ（Ｄ）Ｊ特異的プロモーターからなる群から選択されるプロモーターとの作動可能な連結をもたらす、請求項１～５０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５４】
前記ドナーＤＮＡが、Ｔ細胞特異的プロモーターに作動可能に連結するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項１～５０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５５】
前記ドナーＤＮＡが、プロモーターに作動可能に連結するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項１～５０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５６】
前記ドナーＤＮＡの挿入が、挿入されたドナーＤＮＡの幹細胞特異的又は体細胞特異的な内因性プロモーターとの作動可能な連結をもたらす、請求項１～５０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５７】
前記ドナーＤＮＡが、（例えば、遺伝子編集効率を評価するための）レポータータンパク質（例．近赤外及び／又は遠赤色レポータータンパク質）をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項１～５６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５８】
前記ドナーＤＮＡの挿入が、挿入されたドナーＤＮＡの内因性プロモーターとの作動可能な連結をもたらす、請求項５７に記載の方法。
【請求項５９】
前記ドナーＤＮＡが、前記レポータータンパク質をコードする前記ヌクレオチド配列に

作動可能に連結するプロモーターを含む、請求項５７に記載の方法。
【請求項６０】
前記ドナーＤＮＡが、（ｉ）Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）タンパク質；（ｉｉ）ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ若しくはＩｇＭタンパク質；又は（ｉｉｉ）ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ若しくはＩｇＭタンパク質のκ若しくはλ鎖をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項１～５９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６１】
前記ドナーＤＮＡが、イントロンを有さないタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項１～６０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６２】
前記イントロンを有さないヌクレオチド配列が、ＴＣＲタンパク質又は免疫グロブリンの、全体又は一部分をコードする、請求項６１に記載の方法。
【請求項６３】
前記ドナーＤＮＡが少なくとも１つのアデニル化３’末端を有する、請求項１～６２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６４】
前記標的細胞が哺乳動物細胞である、請求項１～６３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６５】
前記標的細胞がヒト細胞である、請求項１～６４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６６】
（ａ）各末端に５’突出又は３’突出を有する直鎖状の二本鎖ドナーＤＮＡ；及び
（ｂ）配列特異的ヌクレアーゼ、又は前記配列特異的ヌクレアーゼをコードする核酸
を含み、
（ａ）及び（ｂ）が、同じ送達媒体の一部としてのペイロードである、
キット又は組成物。
【請求項６７】
前記送達媒体がナノ粒子である、請求項６６に記載のキット又は組成物。
【請求項６８】
前記ナノ粒子が、（ａ）、（ｂ）、アニオン性ポリマー組成物、カチオン性ポリマー組成物及びカチオン性ポリペプチド組成物を含むコアを含む、請求項６７に記載のキット又は組成物。
【請求項６９】
前記ナノ粒子が、前記ナノ粒子を細胞表面タンパク質にターゲティングするターゲティングリガンドを含む、請求項６７又は６８に記載のキット又は組成物。
【請求項７０】
前記直鎖状二本鎖内ドナーと前記配列特異的ヌクレアーゼが互いに結合してデオキシリボヌクレオタンパク質又はリボ－デオキシリボヌクレオタンパク質複合体を形成する、請求項６６～６９のいずれか一項に記載のキット又は組成物。
【請求項７１】
前記送達媒体が帯電ポリマーであるポリペプチドドメインへとコンジュゲートされたターゲティングリガンドであり、前記ターゲティングリガンドが細胞表面タンパク質に対する結合を提供し、前記帯電ポリマーであるポリペプチドドメインが前記ペイロードと静電相互作用する、請求項６６～７０のいずれか一項に記載のキット又は組成物。
【請求項７２】
前記送達媒体が、前記ペイロード及び前記帯電ポリマーであるポリペプチドドメインと相互作用する、アニオン性ポリマーをさらに含む、請求項７１に記載のキット又は組成物。
【請求項７３】
前記送達媒体が（ａ）及び／又は（ｂ）とコンジュゲートしたターゲティングリガンドであり、前記ターゲティングリガンドが細胞表面タンパク質に対する結合を提供する、請

求項６６～７０のいずれか一項に記載のキット又は組成物。
【請求項７４】
前記細胞表面タンパク質がＣＤ４７である、請求項６９～７３のいずれか一項に記載のキット又は組成物。
【請求項７５】
前記ターゲティングリガンドがＳＩＲＰαタンパク質模倣体である、請求項７４に記載のキット又は組成物。
【請求項７６】
前記送達媒体がエンドサイトーシス誘発性リガンドをさらに含む、請求項６９～７５のいずれか一項に記載のキット又は組成物。
【請求項７７】
前記送達媒体が、水中油中水エマルジョン粒子、水中油エマルジョンミセル粒子、多重膜型水中油中水エマルジョン粒子多層型粒子又はＤＮＡオリガミナノボットをコーティングする、ターゲティングリガンドを含む、請求項６６～７０のいずれか一項に記載のキット又は組成物。
【請求項７８】
前記ターゲティングリガンドが、ペプチド、ＳｃＦｖ、Ｆ（ａｂ）、核酸アプタマー又はペプトイドである、請求項６９～７４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７９】
前記送達媒体が非ウイルス性である、請求項６６～７０のいずれか一項に記載のキット又は組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、2018年4月18日に出願された米国特許仮出願第62/659,627号、2018年6月14日に出願された米国特許仮出願第62/685,243号及び2018年9月25日に出願された米国特許仮出願第62/736,400号の利益を主張し、これらの出願の各々は、参照によりそれらの全体において、ここに組み込まれる。
【０００２】
序説
ゲノム編集は、多くの状況では、依然として非効率的な方法である。効率的なゲノム編集のための組成物及び方法に対する解決されていない重要な要求がある。
【発明の概要】
【０００３】
粘着末端を使用するゲノム編集のための組成物及び方法が提供される。一部の態様では、本発明の方法は、（ａ）標的細胞のゲノムＤＮＡ内の２か所の各々において付着型切断を生成し、これにより、２つの粘着末端（ゲノム付着末端）を生じさせること；及び（ｂ）ドナーＤＮＡの粘着末端がゲノムＤＮＡの粘着末端とハイブリダイズし、ドナーＤＮＡがゲノムへと挿入されるように、ゲノムＤＮＡの粘着末端に対応する付着末端（すなわち、粘着末端）を有する直鎖状の二本鎖ドナーＤＮＡを用意／導入することを含む。本明細書では、この方法はまた一般に、「テトリス法」又は「テトリス法媒介型」ともいう。一部の場合、付着型切断は、標的細胞に１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼ（又は１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼをコードする１つ以上の核酸）、例えば、メガヌクレアーゼ、ホーミングエンドヌクレアーゼ、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、ＴＡＬＥＮ、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエフェクタータンパク質クラス２（ＲＮＡ誘導型ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓポリペプチド）（例．Ｃａｓ９、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ、Ｃｐｆ１（Ｃａｓ１２ａ）、Ｃａｓ１３、ＭＡＤ７など）を導入することにより生成される。
【０００４】
一部の場合、ドナーＤＮＡ及び１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼ（又は１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼをコードする１つ以上の核酸）は、同じ送達媒体のペイロード（例

えば、in vitro、ex vivo又はin vivoで細胞に導入されうる／細胞に送達されうる）である。複数のペイロードを同じ送達媒体（例．ナノ粒子）の一部として送達することの１つの利点は、各ペイロードの効率が低下しないことである。例として述べると、ペイロードＡ及びペイロードＢが２つの別個のパッケージ／媒体（それぞれ、パッケージＡ及びパッケージＢ）により送達される場合、効率は乗算的で、例えばパッケージＡ及びパッケージＢが各々１％のトランスフェクション効率を有する場合、ペイロードＡ及びペイロードＢを同じ細胞に送達する見込みは０．０１％（１％×１％）である。しかし、ペイロードＡ及びペイロードＢがいずれも同じ送達媒体の一部として送達される場合、ペイロードＡ及びペイロードＢを同じ細胞に送達する見込みは１％で、０．０１％に対して１００倍の改善である。

【０００５】

一部の態様では、（例えば同じ送達媒体の一部として）送達される場合、ドナーＤＮＡ（例．ドナーＤＮＡの末端）は１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼ（例．ヌクレアーゼ対）と結合しており、例えば、ドナーＤＮＡは１つ以上のヌクレアーゼと共に「プレアセンブル」されている。ドナーＤＮＡのヌクレアーゼとの共送達は、ゲノムの切断部位への結合時に熱力学的「スイッチング」をもたらすことが可能で、これにより、ヌクレアーゼ（例．ヌクレアーゼ対）はドナーＤＮＡからゲノムに移行し、ドナーＤＮＡがゲノムへと入り込む。本発明の組成物及び方法は、相同性指向修復（ＨＤＲ）を使用せずに（代わりに、挿入はマッチする「粘着末端」により媒介される）、ドナーＤＮＡをＤＮＡ標的へと挿入する方法をもたらす。

【０００６】

送達媒体は、非ウイルス性媒体、ウイルス性媒体、ナノ粒子（例．ターゲティングリガンド、及び／又は、アニオン性ポリマー組成物、カチオン性ポリマー組成物及びカチオン性ポリペプチド組成物を含むコアを含むナノ粒子）、リポソーム、ミセル、水中油中水エマルジョン粒子、水中油エマルジョンミセル粒子、多重膜型水中油中水エマルジョン粒子、帯電ポリマーであるポリペプチドドメインへとコンジュゲートされたターゲティングリガンド（例．ペプチドのターゲティングリガンド）（ここで、ターゲティングリガンドは細胞表面タンパク質に対する結合を提供し、帯電ポリマーであるポリペプチドドメインは、核酸ペイロードと共に凝縮され、及び／又はタンパク質ペイロードと静電相互作用する）、ペイロードとコンジュゲートしたターゲティングリガンド（例．ペプチドであるターゲティングリガンド）（ここで、ターゲティングリガンドは細胞表面タンパク質に対する結合を提供する）などを含みうるが、これらに限定されるものではない。一部の場合、ペイロードは、デオキシリボヌクレオタンパク質複合体又はリボ－デオキシリボヌクレオタンパク質複合体として細胞に導入される。

【０００７】

提供される組成物及び方法は、（例えばin vivoで、例えばＴ細胞を操作するために）任意の細胞内の任意の座位におけるゲノム編集のために使用されうる。例えば、ＣＤ８＋Ｔ細胞集団又はＣＤ８＋及びＣＤ４＋ Ｔ細胞の混合物は、抗原認識のために、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及び／又はＣＤＲ３ドメインの適切なＴＣＲα／ＴＣＲβ対を、一過性に又は恒久的に発現するようにプログラム化されうる。

【０００８】

本発明は、添付した図面を参照する場合に、以下の発明の詳細な説明を最も良く理解することができる。一般的な慣行に従い、図面は必ずしも縮尺どおりではないことが強調される。対照的に、図面は、明確さのために任意に拡大又は縮小することができる。図面には以下の図が含まれる。

【図面の簡単な説明】

【０００９】

【図１】図１は、本発明の粘着末端を伴う直鎖状二本鎖ドナーＤＮＡを例示する概略図である。一方の例では、両方の末端は５’突出を有し、他方の例では、両方の末端は３’突出を有する。

【図２】図２は、本発明の方法を例示する概略図である。
【図３】図３は、送達パッケージ（この例では、ある種のナノ粒子）を例示する概略図である。
【図４】図４は、送達パッケージ（この例では、ある種のナノ粒子）を例示する概略図である。この例では、ナノ粒子は、外側から順に、表面コート（外殻を含む）層、第２の脱落層、中間層（追加のペイロードを含む）及び第１の脱落層により取り囲まれたコア（第１のペイロードを含む）を有する、多層型である。
【図５】図５（パネルＡ～Ｂ）は、本発明のナノ粒子の表面コートにおけるターゲティングリガンドの構成例を示す概略図である。図示された送達分子は、ナノ粒子の脱落層と静電相互作用しているアンカードメインとコンジュゲートしたターゲティングリガンドを含む。ターゲティングリガンドは、Ｎ末端又はＣ末端でコンジュゲートする場合（各パネルの左側）も、内部でコンジュゲートする場合（各パネルの右側）もあることに留意されたい。パネルＡではリンカーを含んでいるが、パネルＢはリンカーを含まない。
【図６－１】図６－１（パネルＡ～Ｂ）は、送達パッケージ（本発明の送達分子を構成する例）を例示する概略図である。ターゲティングリガンドは、Ｎ末端又はＣ末端でコンジュゲートする場合（各パネルの左側）も、内部でコンジュゲートする場合（各パネルの右側）もあることに留意されたい。パネルＡではリンカーを含んでいるが、パネルＢはリンカーを含まない。これらのパネルは、ペイロードとコンジュゲートしたターゲティングリガンドを含む送達分子である。
【図６－２】図６－２（パネルＣ～Ｄ）は、送達パッケージ（本発明の送達分子を構成する例）を例示する概略図である。ターゲティングリガンドは、Ｎ末端又はＣ末端でコンジュゲートする場合（各パネルの左側）も、内部でコンジュゲートする場合（各パネルの右側）もあることに留意されたい。パネルＣではリンカーを含んでいるが、パネルＤはリンカーを含まない。これらのパネルは、核酸ペイロードと凝縮している（及び／又はタンパク質ペイロードと、例えば静電的に、相互作用している）帯電ポリマーであるポリペプチドドメインとコンジュゲートしたターゲティングリガンドを含む送達分子である。
【図７】図７は、使用可能な（例えばナノ粒子の一部として、例えば核局在化シグナル（ＮＬＳ）含有ペプチドとして；ＮＬＳ含有ペプチド、アニオン性ポリマー、カチオン性ポリマー及び／又はカチオン性ポリペプチドなどの一部として／これらにコンジュゲート可能な）ＮＬＳの例を示す。図は、Kosugi et al., J Biol Chem. 2009 Jan 2;284(1):478-85からの転載である［クラス１、上から順に配列番号２０１から配列番号２２１；クラス２、上から順に配列番号２２２から配列番号２２４；クラス４、上から順に配列番号２２５から配列番号２３０；クラス３、上から順に配列番号２３１から配列番号２４５；クラス５、上から順に配列番号２４６から配列番号２６４］。
【図８－１】図８パネルＡは、マウスの造血細胞系統と当該系統内の多様な細胞で同定されたマーカーを示す概略図である。
【図８－２】図８パネルＢは、ヒトの造血細胞系統と当該系統内の多様な細胞で同定されたマーカーを示す概略図である。
【図９－１】図９パネルＡは、細胞の分化及び／又は増殖に影響を及ぼすのに使用可能なｍｉＲＮＡを示す概略図である。
【図９－２】図９パネルＢは、細胞の分化及び／又は増殖に影響を及ぼすのに使用可能なタンパク質を示す概略図である。
【図１０】図１０は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図１１】図１１は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図１２】図１２は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図１３】図１３は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図１４】図１４は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図１５】図１５は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図１６】図１６は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図１７】図１７は、実験結果を示す（実施例参照）。

【図１８】図１８は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図１９】図１９は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図２０】図２０は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図２１】図２１は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図２２】図２２は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図２３】図２３は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図２４】図２４は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図２５】図２５は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図２６】図２６は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図２７】図２７は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図２８】図２８は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図２９】図２９は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図３０】図３０は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図３１】図３１は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図３２】図３２は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図３３】図３３は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図３４】図３４は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図３５】図３５は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図３６】図３６は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図３７】図３７は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図３８】図３８は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図３９】図３９は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図４０】図４０は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図４１】図４１は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図４２】図４２は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図４３】図４３は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図４４】図４４は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図４５】図４５は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図４６】図４６は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図４７】図４７は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図４８】図４８は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図４９】図４９は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図５０】図５０は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図５１】図５１は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図５２】図５２は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図５３】図５３は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図５４】図５４は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図５５】図５５は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図５６】図５６は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図５７】図５７は、実験結果を示す（実施例参照）。
【図５８】図５８は、Ｔ細胞受容体を編集するための標的座位の例を示す。
【図５９】図５９は、ＴＣＲα及びＴＣＲβの、エキソン１及びプロモーター領域において、二本鎖切断を生成するようにデザインされた、ＣＲＩＳＰＲ／ＣＡＳガイド配列及びＴＡＬＥＮ配列の例を示す。
【図６０】図６０は、ゲノムの向かい合う鎖のＴＴＴＶ　ＰＡＭ配列の＋２４及び＋１９において付着型切断を作製するＣｐｆ１（Ｃａｓ１２ａ）のために、ｓｇＲＮＡを設計した方法を示す。適合する突出を有するｄｓＤＮＡインサートは、２つのオリゴ（ｓｓＤＮＡ１及びｓｓＤＮＡ２）をアニーリングさせることにより作製した。一本鎖切断Ｃｐｆ１法では、ＧＦＰ遺伝子挿入が検出されなかったのに対し、ＴＲＢＣ１及びＴＲＢＣ２座位で二本鎖切断を実施したところ、テトリス法媒介型（すなわち、２つの付着末端切断＋付

着末端を伴う二本鎖インサート）ＧＦＰ挿入が見られた。インサートは、Ｆｌａｇ又はＧＦＰをコードし；適合する突出は、この図中に、下線を付して示す。ヌクレオフェクションを介して、６０ｐｍｏｌのＣｐｆ１ ＲＮＰ及び４ｕｇのｄｓＤＮＡを刺激されたＴ細胞に導入した。ヌクレオフェクション後４～１０日目に、細胞を、フローサイトメトリー、及び、ＴＲＢＣ１－ＴＲＢＣ２、ＧＦＰ－ＧＦＰ又はＴＲＢＣ２－ＧＦＰのＰＣＲ増幅により、ＴＣＲノックダウンについてアッセイし、ゲノムの欠失、ＧＦＰドナーの存在及びＧＦＰのＴＲＢＣ１－ＴＲＢＣ２座位への挿入を、それぞれ確認した。

【図６１】図６１は、融解され、ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズと共に培養された翌日から２日間刺激された、低温保存ヒト初代Ｔ細胞のフローサイトメトリー（Attune NxT）の結果を示す。ＴＲＢＣ１／Ｃ２座位の二本鎖切断Ｃｐｆ１媒介型編集と、その後のＧＦＰをコードするｔｅｔｒｉｓＤＮＡ鋳型（すなわち、付着末端を伴う二本鎖インサート）を介した挿入後、細胞の１．２７％がＧＦＰ＋であった。ビーズを除去した翌日、Lonza Amaxa 4Dシステム、Ｐ３初代細胞キットを用いて細胞を電気穿孔した。ＲＮＰは、６４ｐｍｏｌのＡ．ｓ．Ｃｐｆ１（ＩＤＴ、型番：1081068）及び１２８ｐｍｏｌのｓｇＲＮＡ（ＩＤＴ）を、室温で１０～２０分間インキュベートすることにより形成し、次いで、４μｇのｄｓＤＮＡインサート又はＩＤＴ製のＣｐｆ１電気穿孔増強剤（型番：1076301）に添加し、１０分間インキュベートした。２０μＬ中の刺激Ｔ細胞1×10^{6}個を添加し、次いで、キュベットに移し、ＥＨ－１１５（Ｂ、ＲＮＰ単独）又はＥＯ－１１５（Ｃ、ＲＮＰ＋ＤＮＡ）のパルスで電気穿孔した。ヌクレオフェクション後７日目に、ＴＣＲａ／ｂ及びＧＦＰの発現について、フローサイトメトリーによりアッセイした。図は、生細胞集団内の細胞（アネキシン／Sytox陰性）を示す。QuickExtract（Lucigen）を使用して、細胞からＤＮＡを回収した。

【図６２】図６２は、ヒト汎Ｔ細胞内のＴＲＢＣ１及びＴＲＢＣ２座位をターゲティングするＣｐｆ１ ｇＲＮＡによる、ＧＦＰノックイン（レーン４＋５、枠囲いの中のバンド）及びＴＲＢＣ１－ＴＲＢＣ２ノックアウトの成功（レーン１＋２）を示す。ＧＦＰドナーの増幅（レーン７＋８）は、おそらく、細胞内に組み込まれなかったドナーＤＮＡに起因するが、ＧＦＰ－ＴＲＢＣ２プライマーによる場合（レーン４＋５）では抑制されている。ＴＲＢＣ１－ＴＲＢＣ２欠失バンド（７３１ｂｐ）及びＧＦＰ－ＧＦＰバンド（７７４ｂｐ）は、それぞれ、ウェル１～２及び７～８で明確に認められる。５２５ｂｐのノックインバンドは、レーン４及び５で目視可能で、フローサイトメトリー及びＧＦＰ＋細胞を介する約１．２７％の効率的な遺伝子挿入に対応する。

【図６３】図６３は、図６２で観察された陽性及び陰性バンドを示す。

【図６４】図６４は、Ｃ１とＣ２の両者の座位に対する特異性を有し、ゲノム内の２つの切断を実施するＣｐｆ１ガイドを介して、ＴＲＢのエキソン１をターゲティングするＬＬ００３ ｓｇＲＮＡ（Ｃｐｆ）１複合体についての、サンガーシーケンシングの出力波形プロットを示す。その対応する配列は、ＴＡＡＴＴＴＣＴＡＣＴＣＴＴＧＴＡＧＡＴＧＧＴＧＴＧＧＧＡＧＡＴＣＴＣＴＧＣＴＴＣＴＧＡである。ＦＬＡＧ配列又はＴ２Ａ－ＧＦＰ配列のいずれかを、刺激されたヒト初代Ｔ細胞のＲＡＣ座位に挿入した。この図では、細胞はトランスフェクトしなかった。

【図６５】図６５は、Ｃ１とＣ２の両者の座位に対する特異性を有し、ゲノム内の２つの切断を実施するＣｐｆ１ガイドを介して、ＴＲＢのエキソン１をターゲティングするＬＬ００３ ｓｇＲＮＡ（Ｃｐｆ）１複合体についての、サンガーシーケンシングの出力波形プロットを示す。その対応する配列は、ＴＡＡＴＴＴＣＴＡＣＴＣＴＴＧＴＡＧＡＴＧＧＴＧＴＧＧＧＡＧＡＴＣＴＣＴＧＣＴＴＣＴＧＡである。ＦＬＡＧ配列又はＴ２Ａ－ＧＦＰ配列のいずれかを、刺激されたヒト初代Ｔ細胞のＴＲＡＣ座位に挿入した。この図では、ドナーＤＮＡは使用しなかった。

【図６６】図６６は、Ｃ１とＣ２の両者の座位に対する特異性を有し、ゲノム内の２つの切断を実施するＣｐｆ１ガイドを介して、ＴＲＢのエキソン１をターゲティングするＬＬ００３ ｓｇＲＮＡ（Ｃｐｆ）１複合体についての、サンガーシーケンシングの出力波形プロットを示す。その対応する配列は、ＴＡＡＴＴＴＣＴＡＣＴＣＴＴＧＴＡＧＡＴＧＧ

ＴＧＴＧＧＧＡＧＡＴＣＴＣＴＧＣＴＴＣＴＧＡである。ＦＬＡＧ配列又はＴ２Ａ－ＧＦＰ配列のいずれかを、刺激されたヒト初代Ｔ細胞のＴＲＡＣ座位に挿入した。この図では、ＦＬＡＧであるドナーＤＮＡ（付着末端を伴う）は使用しなかった。

【発明を実施するための形態】

【００１０】

上記にまとめられたとおり、粘着末端を使用するゲノム編集のための組成物及び方法が提供される。本発明の方法は、（ａ）標的細胞のゲノムＤＮＡ内の２か所の各々において付着型切断を生成し、これにより２つの粘着末端（ゲノム付着末端）を生じさせること；及び（ｂ）ドナーＤＮＡの粘着末端がゲノムＤＮＡの粘着末端とハイブリダイズし、ドナーＤＮＡがゲノムへと挿入されるように、ゲノムＤＮＡの粘着末端に対応する付着末端（すなわち粘着末端）を有する直鎖状の二本鎖ドナーＤＮＡを用意／導入することを含みうる。一部の場合、付着型切断は、１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼ（又は１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼをコードする１つ以上の核酸）、例えば、メガヌクレアーゼ、ホーミングエンドヌクレアーゼ、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、ＴＡＬＥＮ、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエフェクタータンパク質クラス２、例えば、Ｃａｓ９、Ｃｐｆ１などを、標的細胞に導入することにより生成される。一部の場合、ドナーＤＮＡ及び１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼ（又は１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼをコードする１つ以上の核酸）は、同じ送達媒体のペイロードである。一部の場合、送達媒体は、ナノ粒子（例．ターゲティングリガンド、及び／又は、アニオン性ポリマー組成物、カチオン性ポリマー組成物及びカチオン性ポリペプチド組成物を含むコア、を含むナノ粒子）であり、かつ、一部の場合、ペイロードはナノ粒子のコアの一部である。一部の場合、送達媒体は、帯電ポリマーであるポリペプチドドメインとコンジュゲートしたターゲティングリガンド（例．ペプチドのターゲティングリガンド）を有する対象を送達する分子（ここで、ターゲティングリガンドは細胞表面タンパク質に対する結合を提供し、帯電ポリマーであるポリペプチドドメインはペイロードと相互作用する、例えば、核酸ペイロードと共に凝縮され、及び／又はタンパク質ペイロードと静電相互作用する）である。

【００１１】

本発明の方法及び組成物について説明する前に、本発明は、明細書に記載された特定の方法又は組成物に限定されず、もちろん変化してもよいことを理解すべきである。本発明の範囲は特許請求の範囲によってのみ限定されるのであり、本明細書で使用される用語は、特定の態様のみを説明することを目的し、限定することを意図しているものではないことも理解されたい。

【００１２】

値の範囲が提示される場合は、その範囲の上限と下限との間の、文脈によりそうでないことが明確に指示されない限りにおいて、下限の単位の１０分の１までの各中間値もまた、具体的に開示されることが理解される。任意の言明された値の間の各小範囲、又は言明された範囲内の中間値、及びこの言明された範囲内の他の任意の言明された値又は中間値が、本発明に包含される。これらの小範囲の上限及び下限は、範囲内に独立に含まれてもよく、範囲から独立に除外されてもよく、一方の限界が小範囲に含まれるか、いずれの限界も小範囲に含まれないか、又は両方の限界が小範囲に含まれる各範囲もまた、本発明内に包含され、言明された範囲内の任意の具体的に除外された限界に従う。言明された範囲が限界の一方又は両方を含む場合、これらの含まれた限界の一方又は両方を除外する範囲もまた本発明に含まれる。

【００１３】

そうでないことが規定されない限りにおいて、本明細書で使用される全ての技術及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者において一般的に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書に記載される方法及び材料と同様又は同等である任意の方法及び材料が、本発明の実施又は試行において使用されうるが、一部の可能かつ好ましい方法及び材料が、本明細書では記載される。本明細書で言明される全ての刊行物は、それらとの関連で刊行物が引用される方法及び／又は材料について開示及び記載するように、参照により

本明細書に組み込まれる。矛盾が存在する場合、本開示は、組み込まれた刊行物のいかなる開示にも優先されることが理解される。

【００１４】

本明細書を読んだ当業者には明らかなように、本明細書に記載及び例示される個々の態様の各々は、本発明の精神又は範囲から逸脱しない限りにおいて、他のいくつかの態様のうちのいずれかの特色からたやすく分離されてもよく、また、これらとたやすく組み合わされもよい個別の構成要素及び特色を有する。列挙された任意の方法は、列挙された事象の順序で行われる場合もあり、論理的に可能な他の任意の順序で行われる場合もある。

【００１５】

文脈によりそうでないことが明らかに指示されるのでない限り、この明細書及び特許請求の範囲で使用される単数形の「ある（a）」、「ある（an）」及び「その」は、複数の指示対象を含むことに注意されたい。したがって、例えば、「ある細胞」への言及は複数のこのような細胞を含み、「あるエンドヌクレアーゼ」に対する言及は１つ以上のエンドヌクレアーゼ及び当業者に公知のこれらの同等物を含むなどである。特許請求の範囲は、任意の要素、例えば任意の随意的要素を除外するように起草されてもよいことにさらに注意されたい。したがって、この言明は、請求項要素の列挙に関する、例えば、「単に」、「だけ」といった除外的用語法の使用、又は「否定的」限定の使用のための先行詞として用いられるように意図される。

【００１６】

本明細書で引用される刊行物は、本出願の出願日の前におけるそれらの開示のためだけに提示される。本明細書におけるいかなることがらも、本発明がこのような刊行物に先行する権利が与えられていないことの容認とみなされるべきではない。さらに、提示される刊行日は、独立に確認される必要があってもよい実際の刊行日と異なってもよい。

【００１７】

方法及び組成物

効率的なゲノム編集のための方法及び組成物が提供される。一部の態様では、本発明の方法は、（ａ）標的細胞のゲノム内の２か所で付着末端を伴う二本鎖切断を生成し、これにより第１のゲノム付着末端及び第２のゲノム付着末端を生じさせること；並びに（ｂ）各末端に５’又は３’突出を有する直鎖状の二本鎖ドナーＤＮＡを導入することを含み、ここで、ドナーＤＮＡの１つの末端が第１のゲノム付着末端とハイブリダイズし、ドナーＤＮＡの他の末端が第２のゲノム付着末端とハイブリダイズし、この結果として、直鎖状の二本鎖ドナーＤＮＡの、標的細胞のゲノムへの挿入をもたらす。

【００１８】

部位特異的ヌクレアーゼをコードする核酸は、目的の核酸であることが可能であり、例えば送達媒体の核酸ペイロードとして、核酸は直鎖状の場合もあり環状の場合もあり、プラスミド、ウイルスゲノム、ＲＮＡなどでありうる。「核酸」という用語は修飾核酸を包含する。例えば、核酸分子は模倣体であることが可能で、修飾糖骨格、１つ以上の修飾ヌクレオシド間連結（例．１つ以上のホスホロチオエート連結及び／又はヘテロ原子によるヌクレオシド間連結）、１つ以上の修飾塩基などを含みうる。一部の態様では、本発明のペイロードは三重鎖形成性ペプチド核酸（ＰＮＡ）を含む（例えば、McNeer et al., Gene Ther. 2013 Jun;20(6):658-69参照）。本発明のドナーＤＮＡは、二本鎖の直鎖状で付着末端を有する（すなわち、直鎖状ドナーＤＮＡの各末端は突出を有する）。

【００１９】

ゲノム付着末端（２か所）の生成

一部の場合、付着型切断を生成するために、部位特異的ヌクレアーゼ（１つ以上の部位特異的ヌクレアーゼ）（又はこれをコードする核酸、例えば１つ以上の核酸）が標的細胞に導入される。標的細胞がin vivoで存在する場合、これは、適切な構成要素（例えば１つ以上の送達媒体の一部としての）を個体に投与することにより達せられうる。一部の場合、標的細胞は部位特異的ヌクレアーゼをコードするＤＮＡ（これは、例えば誘導可能なプロモーターに作動可能に連結されうる（この制御下にありうる））を含み、本発明の方

法の「生成する」工程は部位特異的ヌクレアーゼの発現を誘導することを含む。

【００２０】

（２か所でゲノムを切断した後の）２つのゲノム付着末端の各突出は、独立に、５’又は３’の一本鎖突出でありうる。例えば一部の場合、（２か所でゲノムを切断した後の）ゲノム付着末端の両方は５’突出を有しうる。一部の場合、ゲノムの付着末端の両方は３’突出を有する。一部の場合、１つのゲノム付着末端（２つの切断箇所のうちの１つにおける）は５’突出を有するが、他のゲノム付着末端（他の切断箇所における）は３’突出を有する。

【００２１】

（ゲノムを２か所で切断した後の）２つのゲノム付着末端の各突出は、任意の好都合な長さでありうる。一部の態様では、（２か所でゲノムを切断した後の）２つのゲノム付着末端の各突出は、独立に、２～２０ヌクレオチド（ｎｔ）（例．２～１８、２～１５、２～１２、２～１０、２～８、２～７、２～６、２～５、３～２０、３～１８、３～１５、３～１２、３～１０、３～８、３～７、３～６、３～５、４～２０、４～１８、４～１５、４～１２、４～１０、４～８、４～７又は４～６ヌクレオチド）の長さでありうる。一部の場合、（２か所でゲノムを切断した後の）２つのゲノム付着末端の各突出は、独立に、２～２０ヌクレオチドの長さでありうる。一部の場合、（２か所でゲノムを切断した後の）２つのゲノム付着末端の各突出は、独立に、２～１５ヌクレオチドの長さでありうる。一部の場合、（２か所でゲノムを切断した後の）２つのゲノム付着末端の各突出は、独立に、２～１０ヌクレオチドの長さでありうる。

【００２２】

一部の態様では、２つの付着末端切断（ゲノム内の２か所）を生成する前の２か所の間隔は、１，０００，０００塩基対（ｂｐ）以下（例．５００，０００ｂｐ以下、１００，０００ｂｐ以下、５０，０００ｂｐ以下、１０，０００ｂｐ以下、１，０００ｂｐ以下、７５０ｂｐ以下又は５００ｂｐ以下）である。一部の場合、２か所の間隔は１００，０００ｂｐ以下である。一部の場合、２か所の間隔は５０，０００ｂｐ以下である。一部の態様では、２つの付着末端切断（ゲノム内の２か所）を生成する前の２か所の間隔は、５～１，０００，０００塩基対（ｂｐ）（例．５～５００，０００、５～１００，０００、５～５０，０００、５～１０，０００、５～５，０００、５～１，０００、５～５００、１０～１，０００，０００、１０～５００，０００、１０～１００，０００、１０～５０，０００、１０～１０，０００、１０～５，０００、１０～１，０００、１０～５００、５０～１，０００，０００、５０～５００，０００、５０～１００，０００、５０～５０，０００、５０～１０，０００、５０～５，０００、５０～１，０００、５０～５００、１００～１，０００，０００、１００～５００，０００、１００～１００，０００、１００～５０，０００、１００～１０，０００、１００～５，０００、１００～１，０００、１００～５００、３００～１，０００，０００、３００～５００，０００、３００～１００，０００、３００～５０，０００、３００～１０，０００、３００～５，０００、３００～１，０００、３００～５００、５００～１，０００，０００、５００～５００，０００、５００～１００，０００、５００～５０，０００、５００～１０，０００、５００～５，０００、５００～１，０００、１，０００～１，０００，０００、１，０００～５００，０００、１，０００～１００，０００、１，０００～５０，０００、１，０００～１０，０００又は１，０００～５，０００ｂｐ）である。

【００２３】

一部の場合、２か所の間隔は２０～１，０００，０００ｂｐである。一部の場合、２か所の間隔は２０～５００，０００ｂｐである。一部の場合、２か所の間隔は２０～１５０，０００ｂｐである。一部の場合、２か所の間隔は２０～５０，０００ｂｐである。一部の場合、２か所の間隔は２０～２０，０００ｂｐである。一部の場合、２か所の間隔は２０～１５，０００ｂｐである。一部の場合、２か所の間隔は２０～１０，０００ｂｐである。

【００２４】

一部の場合、２か所の間隔は５００～１，０００，０００ｂｐである。一部の場合、２か所の間隔は５００～５００，０００ｂｐである。一部の場合、２か所の間隔は５００～１５０，０００ｂｐである。一部の場合、２か所の間隔は５００～５０，０００ｂｐである。一部の場合、２か所の間隔は５００～２０，０００ｂｐである。一部の場合、２か所の間隔は５００～１５，０００ｂｐである。一部の場合、２か所の間隔は５００～１０，０００ｂｐである。

【００２５】

一部の場合、２か所の間隔は１，０００～１，０００，０００ｂｐである。一部の場合、２か所の間隔は１，０００～５００，０００ｂｐである。一部の場合、２か所の間隔は１，０００～１５０，０００ｂｐである。一部の場合、２か所の間隔は１，０００～５０，０００ｂｐである。一部の場合、２か所の間隔は１，０００～２０，０００ｂｐである。一部の場合、２か所の間隔は１，０００～１５，０００ｂｐである。一部の場合、２か所の間隔は１，０００～１０，０００ｂｐである。

【００２６】

一部の場合、２か所の間隔は５，０００～１，０００，０００ｂｐである。一部の場合、２か所の間隔は５，０００～５００，０００ｂｐである。一部の場合、２か所の間隔は５，０００～１５０，０００ｂｐである。一部の場合、２か所の間隔は５，０００～５０，０００ｂｐである。一部の場合、２か所の間隔は５，０００～２０，０００ｂｐである。一部の場合、２か所の間隔は５，０００～１５，０００ｂｐである。一部の場合、２か所の間隔は５，０００～１０，０００ｂｐである。

【００２７】

本発明の部位特異的ヌクレアーゼは、ゲノムＤＮＡ内に二本鎖切断を導入して付着末端を生成しうる（例えばＤＮＡの向かい合う鎖内の２つのオフセットの一本鎖切断を介して）部位特異的ヌクレアーゼである。一部の場合、部位特異的ヌクレアーゼ、例えばメガヌクレアーゼ（又はＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエフェクタータンパク質クラス２（例．Ｃｐｆ１））は、付着末端を天然で生成する。一部の部位特異的ヌクレアーゼは操作タンパク質（例．亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）及び転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ））であり、一部の場合、このようなタンパク質は付着末端を生成するタンパク質対として使用される。一部の場合、部位特異的ヌクレアーゼは、平滑一本鎖切断を天然で生成する部位特異的ヌクレアーゼ（例えばＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエフェクタータンパク質クラス２（例．Ｃａｓ９））であるが、タンパク質がニカーゼ（ＤＮＡの１つの鎖だけを切断する）であるように突然変異を導入されている。ニカーゼタンパク質、例えば突然変異ニカーゼＣａｓ９は、標的ＤＮＡの向かい合う鎖をターゲティングする２つのガイドＲＮＡを使用することにより、付着末端を生成するのに使用されうる。したがって一部の場合、本発明の方法は、配列特異的ニカーゼ（例えばニカーゼであるＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエフェクタータンパク質クラス２（例．ニカーゼであるＣａｓ９））を、２つのガイドＲＮＡと共に使用して、２つのゲノム箇所のうちの（少なくとも）１つにおいて、付着型切断を生成することを含む。一部の場合、本発明の方法は、配列特異的ニカーゼ（例えばニカーゼであるＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエフェクタータンパク質クラス２（例．Ｃａｓ９））を４つのガイドＲＮＡと共に使用し、２つのゲノムか所で２つの付着型切断を生成することを含む。

【００２８】

任意の好都合な部位特異的ヌクレアーゼ（例えば遺伝子編集タンパク質（例．任意の好都合なプログラム型遺伝子編集タンパク質））が使用されうる。適切なプログラム型遺伝子編集タンパク質の例は、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、及びＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ＲＮＡ誘導型ポリペプチド（例．Ｃａｓ９、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ、Ｃｐｆ１、Ｃａｓ１３、ＭＡＤ７など）を含むが、これらに限定されない。使用されうる部位特異的ヌクレアーゼの例は、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、及びＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ＲＮＡ誘導型ポリペプチド（例．Ｃａｓ９、Ｃａｓ

Ｘ、ＣａｓＹ、Ｃｐｆ１、Ｃａｓ１３、ＭＡＤ７など）；メガヌクレアーゼ（例．Ｉ－ＳｃｅＩ、Ｉ－ＣｅｕＩ、Ｉ－ＣｒｅＩ、Ｉ－ＤｍｏＩ、Ｉ－ＣｈｕＩ、Ｉ－ＤｉｒＩ、Ｉ－ＦｌｍｕＩ、Ｉ－ＦｌｍｕＩＩ、Ｉ－Ａｎｉｌ、Ｉ－ＳｃｅＩＶ、Ｉ－ＣｓｍＩ、Ｉ－ＰａｎＩ、Ｉ－ＰａｎＩＩ、Ｉ－ＰａｎＭＩ、Ｉ－ＳｃｅＩＩ、Ｉ－ＰｐｏＩ、Ｉ－ＳｃｅＩＩＩ、Ｉ－ＬｔｒＩ、Ｉ－ＧｐｉＩ、Ｉ－ＧＺｅＩ、Ｉ－ＯｎｕＩ、Ｉ－ＨｊｅＭＩ、Ｉ－ＭｓｏＩ、Ｉ－ＴｅｖＩ、Ｉ－ＴｅｖＩＩ、Ｉ－ＴｅｖＩＩＩ、ＰＩ－ＭｌｅＩ、ＰＩ－ＭｔｕＩ、ＰＩ－ＰｓｐＩ、ＰＩ－Ｔｌｉ ＩＩ、ＰＩ－ＳｃｅＶなど）；並びにホーミングエンドヌクレアーゼを含むが、これらに限定されない。

【００２９】

一部の場合、送達媒体は遺伝子編集ツール（すなわち遺伝子編集システム（例えばプログラム型遺伝子編集システムのような部位特異的切断システム）の構成要素）をコードする核酸を送達するのに使用される。例えば、核酸ペイロードは、（ｉ）ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ、（ｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ、（ｉｉｉ）プログラム型遺伝子編集タンパク質、例えば亜鉛フィンガータンパク質（ＺＦＰ）（例．亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ））、転写活性化因子様エフェクター（ＴＡＬＥ）タンパク質（例えばヌクレアーゼへと融合させたＴＡＬＥタンパク質（ＴＡＬＥＮ））、及び／又はＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ＲＮＡ誘導型ポリペプチド（例．Ｃａｓ９、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ、Ｃｐｆ１、Ｃａｓ１３、ＭＡＤ７など）をコードするＤＮＡ及び／又はＲＮＡ；（ｉｖ）メガヌクレアーゼをコードするＤＮＡ及び／又はＲＮＡ；（ｖ）ホーミングエンドヌクレアーゼをコードするＤＮＡ及び／又はＲＮＡ；並びに（ｉｖ）ドナーＤＮＡ分子のうちの１つ又は複数を含みうる。

【００３０】

一部の場合、本発明の送達媒体は、タンパク質ペイロード、（ＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ＲＮＡ誘導型ポリペプチド（ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエフェクタータンパク質クラス２）（例．Ｃａｓ９、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ、Ｃｐｆ１、Ｃａｓ１３、ＭＡＤ７など）のようなタンパク質）、メガヌクレアーゼ及びホーミングエンドヌクレアーゼを送達するのに使用される。

【００３１】

システムの性質及び所望の帰結に応じて、遺伝子編集システム（例えばプログラム型遺伝子編集システムのような部位特異的遺伝子編集システム）は、単一の構成要素（例．ＺＦＰ、ＺＦＮ、ＴＡＬＥ、ＴＡＬＥＮ、メガヌクレアーゼなど）を含む場合もあり、複数の構成要素を含む場合もある。一部の場合、遺伝子編集システムは、少なくとも２つの構成要素を含む。例えば一部の場合、遺伝子編集システム（例．プログラム型遺伝子編集システム）は、（ｉ）ドナーＤＮＡ分子の核酸；及び（ｉｉ）遺伝子編集タンパク質（例えば、ＺＦＰ、ＺＦＮ、ＴＡＬＥ、ＴＡＬＥＮのようなプログラム型遺伝子編集タンパク質、高度好塩菌（Natronobacterium gregoryi）のArgonaute（ＮｇＡｇｏ）のようなＤＮＡ誘導型ポリペプチド、Ｃａｓ９、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ、又はＣｐｆ１、Ｃａｓ１３、ＭＡＤ７などのようなＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ＲＮＡ誘導型ポリペプチド）、又は遺伝子編集タンパク質をコードする核酸分子（例．プラスミド又はｍＲＮＡのようなＤＮＡ又はＲＮＡ）を含む。別の例として述べると、一部の場合、遺伝子編集システム（例．プログラム型遺伝子編集システム）は、（ｉ）ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ、又はＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ；及び（ｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ／ＣＡＳ ＲＮＡ誘導型ポリペプチド（例．Ｃａｓ９、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ、Ｃｐｆ１、Ｃａｓ１３、ＭＡＤ７など）、又はＲＮＡ誘導型ポリペプチドをコードする核酸分子（例．プラスミド又はｍＲＮＡのようなＤＮＡ又はＲＮＡ）を含む。別の例として述べると、一部の場合、遺伝子編集システム（例．プログラム型遺伝子編集システム）は、（ｉ）ＮｇＡｇｏ様ガイドＤＮＡ；及び（ｉｉ）ＤＮＡ誘導型ポリペプチド（例．ＮｇＡｇｏ）又はＤＮＡ誘導型ポリペプチドをコードする核酸分子（例．プラスミド又はｍＲＮＡのようなＤＮＡ又はＲＮＡ）を含む。一部の場合、遺伝子編集システム（例．プログラム型遺伝子編集システム）は、少なくとも３つの構成要素：（ｉ）ドナーＤＮＡ分子；（ｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃ

ａｓガイドＲＮＡ又はＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ；及び（ｉｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ＲＮＡ誘導型ポリペプチド（例．Ｃａｓ９、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ又はＣｐｆ１）又はＲＮＡ誘導型ポリペプチドをコードする核酸分子（例．プラスミド又はｍＲＮＡのようなＤＮＡ又はＲＮＡ）を含む。一部の場合、遺伝子編集システム（例．プログラム型遺伝子編集システム）は、少なくとも３つの構成要素：（ｉ）ドナーＤＮＡ分子；（ｉｉ）ＮｇＡｇｏ様ガイドＤＮＡ又はＮｇＡｇｏ様ガイドＤＮＡをコードするＤＮＡ；及び（ｉｉｉ）ＤＮＡ誘導型ポリペプチド（例．ＮｇＡｇｏ）又はＤＮＡ誘導型ポリペプチドをコードする核酸分子（例．プラスミド又はｍＲＮＡのようなＤＮＡ又はＲＮＡ）を含む。

【００３２】

一部の態様では、送達媒体のペイロードは１つ以上の遺伝子編集ツールを含む。本明細書では、「遺伝子編集ツール」という用語は、遺伝子編集システムの１つ以上の構成要素を指すように使用される。したがって一部の場合、ペイロードは遺伝子編集システムを含み、一部の場合、ペイロードは遺伝子編集システムの１つ以上の構成要素（すなわち、１つ以上の遺伝子編集ツール）を含む。例えば、標的細胞は遺伝子編集システムの構成要素のうちの１つを既に含んでいてもよく、使用者は残りの構成要素だけを必要とする。このような場合には、本発明のナノ粒子のペイロードは、所与の遺伝子編集システムの構成要素の全てを必ずしも含まない。このように、一部の場合、ペイロードは１つ以上の遺伝子編集ツールを含む。

【００３３】

代表的な例として述べると、標的細胞は、遺伝子編集タンパク質（例．ＺＦＰ、ＴＡＬＥ）、ＤＮＡ誘導型ポリペプチド（例．ＮｇＡｇｏ）、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ＲＮＡ誘導型ポリペプチド（例．Ｃａｓ９、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ、Ｃｐｆ１、Ｃａｓ１３、ＭＡＤ７など）及び／又はタンパク質をコードするＤＮＡ若しくはＲＮＡを既に含んでいてもよい場合があり、したがって、ペイロードは、（ｉ）ドナーＤＮＡ分子；及び（ｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ若しくはＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ又はＮｇＡｇｏ様ガイドＤＮＡのうちの１つ又は複数を含みうる。同様に、標的細胞は、ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ、及び／若しくはガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ又はＮｇＡｇｏ様ガイドＤＮＡを既に含んでいてもよく、ペイロードは、（ｉ）ドナーＤＮＡ分子；及び（ｉｉ）ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ＲＮＡ誘導型ポリペプチド（例．Ｃａｓ９、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ、Ｃｐｆ１、Ｃａｓ１３、ＭＡＤ７など）若しくはＲＮＡ誘導型ポリペプチドをコードする核酸分子（例．プラスミド又はｍＲＮＡのようなＤＮＡ又はＲＮＡ）；又はＤＮＡ誘導型ポリペプチド（例．ＮｇＡｇｏ）若しくはＤＮＡ誘導型ポリペプチドをコードする核酸分子のうちの１つ又は複数を含みうる。

【００３４】

プログラム型遺伝子編集ツール（例えばＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ＲＮＡ誘導型タンパク質（例．Ｃａｓ９、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ及びＣｐｆ１）、亜鉛フィンガータンパク質（例．亜鉛フィンガーヌクレアーゼ）、ＴＡＬＥタンパク質（例．ＴＡＬＥＮ）、ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡなど）に関するさらなる情報については、例えば、Dreier, et al., (2001) J Biol Chem 276:29466-78；Dreier, et al., (2000) J Mol Biol 303:489-502；Liu, et al., (2002) J Biol Chem 277:3850-6)；Dreier, et al., (2005) J Biol Chem 280:35588-97；Jamieson, et al., (2003) Nature Rev Drug Discov 2:361-8；Durai, et al., (2005) Nucleic Acids Res 33:5978-90；Segal, (2002) Methods 26:76-83；Porteus and Carroll, (2005) Nat Biotechnol 23:967-73；Pabo, et al., (2001) Ann Rev Biochem 70:313-40；Wolfe, et al., (2000) Ann Rev Biophys Biomol Struct 29:183-212；Segal and Barbas, (2001) Curr Opin Biotechnol 12:632-7；Segal, et al., (2003) Biochemistry 42:2137-48；Beerli and Barbas, (2002) Nat Biotechnol 20:135-41；Carroll, et al., (2006) Nature Protocols 1:1329；Ordiz, et al., (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99:13290-5；Guan, et al., (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99:13296-301；Sanjana et al., Nature Protocols, 7:171-192 (2012)；Zetsche et al, Cell. 201

5 Oct 22;163(3):759-71；Makarova et al, Nat Rev Microbiol. 2015 Nov;13(11):722-36；Shmakov et al., Mol Cell. 2015 Nov 5;60(3):385-97；Jinek et al., Science. 2012 Aug 17;337(6096):816-21；Chylinski et al., RNA Biol. 2013 May;10(5):726-37；Ma et al., Biomed Res Int. 2013;2013:270805；Hou et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Sep 24;110(39):15644-9；Jinek et al., Elife. 2013;2:e00471；Pattanayak et al., Nat Biotechnol. 2013 Sep;31(9):839-43；Qi et al, Cell. 2013 Feb 28;152(5):1173-83；Wang et al., Cell. 2013 May 9;153(4):910-8；Auer et. al., Genome Res. 2013 Oct 31；Chen et. al., Nucleic Acids Res. 2013 Nov 1;41(20):e19；Cheng et. al., Cell Res. 2013 Oct;23(10):1163-71；Cho et. al., Genetics. 2013 Nov;195(3):1177-80；DiCarlo et al., Nucleic Acids Res. 2013 Apr;41(7):4336-43；Dickinson et. al., Nat Methods. 2013 Oct;10(10):1028-34；Ebina et. al., Sci Rep. 2013;3:2510；Fujii et. al, Nucleic Acids Res. 2013 Nov 1;41(20):e187；Hu et. al., Cell Res. 2013 Nov;23(11):1322-5；Jiang et. al., Nucleic Acids Res. 2013 Nov 1;41(20):e188；Larson et. al., Nat Protoc. 2013 Nov;8(11):2180-96；Mali et. at., Nat Methods. 2013 Oct;10(10):957-63；Nakayama et. al., Genesis. 2013 Dec;51(12):835-43；Ran et. al., Nat Protoc. 2013 Nov;8(11):2281-308；Ran et. al., Cell. 2013 Sep 12;154(6):1380-9；Upadhyay et. al., G3 (Bethesda). 2013 Dec 9;3(12):2233-8；Walsh et. al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Sep 24;110(39):15514-5；Xie et. al., Mol Plant. 2013 Oct 9；Yang et. al., Cell. 2013 Sep 12;154(6):1370-9；Briner et al., Mol Cell. 2014 Oct 23;56(2):333-9；Burstein et al., Nature. 2016 Dec 22 - Epub ahead of print；Gao et al., Nat Biotechnol. 2016 Jul 34(7):768-73；及びShmakov et al., Nat Rev Microbiol. 2017 Mar;15(3):169-182；並びに国際特許出願公開番号、WO2002099084；WO00/42219；WO02/42459；WO2003062455；WO03/080809；WO05/014791；WO05/084190；WO08/021207；WO09/042186；WO09/054985及びWO10/065123；米国特許出願公開番号、20030059767；20030108880；20140068797；20140170753；20140179006；20140179770；20140186843；20140186919；20140186958；20140189896；20140227787；20140234972；20140242664；20140242699；20140242700；20140242702；20140248702；20140256046；20140273037；20140273226；20140273230；20140273231；20140273232；20140273233；20140273234；20140273235；20140287938；20140295556；20140295557；20140298547；20140304853；20140309487；20140310828；20140310830；20140315985；20140335063；20140335620；20140342456；20140342457；20140342458；20140349400；20140349405；20140356867；20140356956；20140356958；20140356959；20140357523；20140357530；20140364333；20140377868；20150166983及び20160208243；並びに米国特許番号、6,140,466；6,511,808；6,453,242 8,685,737；8,906,616；8,895,308；8,889,418；8,889,356；8,871,445；8,865,406；8,795,965；8,771,945及び8,697,359を参照；これらの全ては、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【００３５】

ドナーＤＮＡ及びゲノムの付着末端

本発明のドナーＤＮＡは、粘着末端（すなわち付着末端）を伴う直鎖状二本鎖ＤＮＡ（例えば図１参照）である。本発明のドナーＤＮＡは直鎖状であり、（ｉ）互いとハイブリダイズされて塩基対を形成する２つのＤＮＡ鎖、及び（ｉｉ）各末端における一本鎖突出を有する。一部の場合、（例えばゲノムＤＮＡの２つの区画を編集するのに）２つのドナーＤＮＡが使用され、この場合、４つの付着型切断（ドナーＤＮＡ　１つ当たり２つずつ）がゲノムへに導入される。

【００３６】

一部の場合、ドナーＤＮＡの２つの鎖は、互いとハイブリダイズされて合計１０塩基対（ｂｐ）以上（例．２０ｂｐ以上、３０ｂｐ以上、５０ｂｐ以上、１００ｂｐ以上又は２００ｂｐ以上）を形成する。言い換えれば、一部の場合、本発明のドナーＤＮＡは１０ｂｐ以上（例．２０ｂｐ以上、３０ｂｐ以上、５０ｂｐ以上、１００ｂｐ以上又は２００ｂｐ以上）である。

【００３７】
一部の場合、本発明のドナーＤＮＡは、合計１０塩基対（ｂｐ）～１００キロ塩基対（ｋｂｐ）（例．１０ｂｐ～７０ｋｂｐ、１０ｂｐ～５０ｋｂｐ、１０ｂｐ～４０ｋｂｐ、１０ｂｐ～２５ｋｂｐ、１０ｂｐ～１５ｋｂｐ、１０ｂｐ～１０ｋｂｐ、１０ｂｐ～１ｋｂｐ、１０ｂｐ～７５０ｂｐ、１０ｂｐ～５００ｂｐ、１０ｂｐ～２５０ｂｐ、１０ｂｐ～１５０ｂｐ、１０ｂｐ～１００ｂｐ、１０ｂｐ～５０ｂｐ、１８ｂｐ～１００ｋｂｐ、１８ｂｐ～７０ｋｂｐ、１８ｂｐ～５０ｋｂｐ、１８ｂｐ～４０ｋｂｐ、１８ｂｐ～２５ｋｂｐ、１８ｂｐ～１５ｋｂｐ、１８ｂｐ～１０ｋｂｐ、１８ｂｐ～１ｋｂｐ、１８ｂｐ～７５０ｂｐ、１８ｂｐ～５００ｂｐ、１８ｂｐ～２５０ｂｐ、１８ｂｐ～１５０ｂｐ、２５ｂｐ～１００ｋｂｐ、２５ｂｐ～７０ｋｂｐ、２５ｂｐ～５０ｋｂｐ、２５ｂｐ～４０ｋｂｐ、２５ｂｐ～２５ｋｂｐ、２５ｂｐ～１５ｋｂｐ、２５ｂｐ～１０ｋｂｐ、２５ｂｐ～１ｋｂｐ、２５ｂｐ～７５０ｂｐ、２５ｂｐ～５００ｂｐ、２５ｂｐ～２５０ｂｐ、２５ｂｐ～１５０ｂｐ，５０ｂｐ～１００ｋｂｐ、５０ｂｐ～７０ｋｂｐ、５０ｂｐ～５０ｋｂｐ、５０ｂｐ～４０ｋｂｐ、５０ｂｐ～２５ｋｂｐ、５０ｂｐ～１５ｋｂｐ、５０ｂｐ～１０ｋｂｐ、５０ｂｐ～１ｋｂｐ、５０ｂｐ～７５０ｂｐ、５０ｂｐ～５００ｂｐ、５０ｂｐ～２５０ｂｐ、５０ｂｐ～１５０ｂｐ、１００ｂｐ～１００ｋｂｐ、１００ｂｐ～７０ｋｂｐ、１００ｂｐ～５０ｋｂｐ、１００ｂｐ～４０ｋｂｐ、１００ｂｐ～２５ｋｂｐ、１００ｂｐ～１５ｋｂｐ、１００ｂｐ～１０ｋｂｐ、１００ｂｐ～１ｋｂｐ、１００ｂｐ～７５０ｂｐ、１００ｂｐ～５００ｂｐ、１００ｂｐ～２５０ｂｐ、２００ｂｐ～１００ｋｂｐ、２００ｂｐ～７０ｋｂｐ、２００ｂｐ～５０ｋｂｐ、２００ｂｐ～４０ｋｂｐ、２００ｂｐ～２５ｋｂｐ、２００ｂｐ～１５ｋｂｐ、２００ｂｐ～１０ｋｂｐ、２００ｂｐ～１ｋｂｐ、２００ｂｐ～７５０ｂｐ又は２００ｂｐ～５００ｂｐ）である。言い換えれば、一部の場合、ドナーＤＮＡの２つの鎖は、互いとハイブリダイズされて合計１０ｂｐ～１００ｋｂｐを形成する。一部の場合、本発明のドナーＤＮＡは合計１０ｂｐ～５０ｋｂｐである。一部の場合、本発明のドナーＤＮＡは合計１０ｂｐ～１０ｋｂｐである。一部の場合、本発明のドナーＤＮＡは合計１０ｂｐ～１ｋｂｐである。一部の場合、本発明のドナーＤＮＡは合計２０ｂｐ～５０ｋｂｐである。一部の場合、本発明のドナーＤＮＡは合計２０ｂｐ～１０ｋｂｐである。一部の場合、本発明のドナーＤＮＡは合計２０ｂｐ～１ｋｂｐである。

【００３８】
一部の態様では、ドナーＤＮＡの突出の長さは既知で、十分に特定されている。ＴＡＬＥＮのようなヌクレアーゼを使用して大型の鋳型からドナーＤＮＡを切断する場合、未知のさまざまな突出長のドナーＤＮＡの集団が生じる可能性がある。他方、ドナーＤＮＡは、ドナーＤＮＡの集団が、共通で既知の特定の長さの突出を有する同じドナーＤＮＡのコピーとなるように合成（例．in vitro合成）することができる。一部の場合、ＰＣＲ産物としてドナーＤＮＡを製造し、これをその後、酵素（例．制限酵素又はＣａｓ９のようなＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエフェクタータンパク質クラス２）で消化して粘着末端を生成する。

【００３９】
本発明のドナーＤＮＡの各末端は、独立に、５’又は３’の一本鎖突出を有しうる。例えば一部の場合、ドナーＤＮＡの両方の末端は５’突出を有する。一部の場合、ドナーＤＮＡの両方の末端は３’突出を有する。一部の場合、ドナーＤＮＡの１つの末端は５’突出を有するが、他の末端は３’突出を有する。各突出は任意の好都合な長さでありうる。一部の場合、各突出の長さは、独立に、２～２００ヌクレオチド（ｎｔ）（例．２～１５０、２～１００、２～５０、２～２５、２～２０、２～１５、２～１２、２～１０、２～８、２～７、２～６、２～５、３～１５０、３～１００、３～５０、３～２５、３～２０、３～１５、３～１２、３～１０、３～８、３～７、３～６、３～５、４～１５０、４～１００、４～５０、４～２５、４～２０、４～１５、４～１２、４～１０、４～８、４～７、４～６、５～１５０、５～１００、５～５０、５～２５、５～２０、５～１５、５～１２、５～１０、５～８又は５～７ヌクレオチド参照）の長さでありうる。一部の場合、

各突出の長さは独立に２～２０ヌクレオチドの長さでありうる。一部の場合、各突出の長さは独立に２～１５ヌクレオチドの長さでありうる。一部の場合、各突出の長さは独立に２～１０ヌクレオチドの長さでありうる。一部の場合、各突出の長さは独立に２～７ヌクレオチドの長さでありうる。

【００４０】

ドナーＤＮＡが、（２か所でゲノムが切断された後の）ゲノムの２つの付着末端（本明細書ではゲノム付着末端とも称する）に挿入される場合、ドナーＤＮＡの各末端は、合計２～２０塩基対（ｂｐ）（例．２～１８、２～１６、２～１５、２～１２、２～１０、２～８、２～６、２～５、３～２０、３～１８、３～１６、３～１５、３～１２、３～１０、３～８、３～６、３～５、４～２０、４～１８、４～１６、４～１５、４～１２、４～１０、４～８、４～６、５～２０、５～１８、５～１６、５～１５、５～１２、５～１０、８～２０、８～１８、８～１６、８～１５、８～１２、８～１０、５～８、１０～２０、１０～１８、１０～１６、１０～１５又は１０～１２ｂｐ）を超えるゲノムの突出と、独立にハイブリダイズしうる。一部の場合、ドナーＤＮＡの突出の長さはゲノムの突出の長さ以下である。一部の場合、ゲノムの突出の長さはドナーＤＮＡの突出の長さ以下である。

【００４１】

一部の態様では、ドナーＤＮＡは少なくとも１つのアデニル化３’末端を有する。

【００４２】

一部の場合、ドナーＤＮＡは模倣体を含み、修飾糖骨格、１つ以上の修飾ヌクレオシド間連結（例．１つ以上のホスホロチオエート連結及び／又はヘテロ原子によるヌクレオシド間連結）、１つ以上の修飾塩基などを含みうる。

【００４３】

送達媒体／ペイロード

一部の態様では、本発明の組成物（例えば、１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼ、１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼをコードする１つ以上の核酸、直鎖状の二本鎖ドナーＤＮＡなど）は、送達媒体のペイロードとして（例えば一部の場合、同じ送達媒体のペイロードとして）細胞に送達される。例えば一部の場合、本発明の（各末端に突出を伴う）直鎖状の二本鎖ドナーＤＮＡ、及び１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼ（例．メガヌクレアーゼ、ホーミングエンドヌクレアーゼ、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ、ＴＡＬＥＮ、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエフェクタータンパク質）（又は１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼをコードするさらなる核酸）は、同じ送達媒体のペイロードである。一部のこのような場合、ペイロードは、一体に結合しデオキシリボヌクレオタンパク質複合体（例えばドナーＤＮＡ及びヌクレアーゼを含む複合体）又はリボ－デオキシリボヌクレオタンパク質複合体（例えばＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをさらに含む複合体）を形成する。

【００４４】

送達媒体は、非ウイルス性媒体、ウイルス性媒体、ナノ粒子（例．ターゲティングリガンド、及び／又は、アニオン性ポリマー組成物、カチオン性ポリマー組成物及びカチオン性ポリペプチド組成物を含む、コアを含むナノ粒子）、リポソーム、ミセル、水中油中水エマルジョン粒子、水中油エマルジョンミセル粒子、多重膜型水中油中水エマルジョン粒子、帯電ポリマーであるポリペプチドドメインとコンジュゲートしたターゲティングリガンド（例．ペプチドのターゲティングリガンド）（ここで、ターゲティングリガンドは細胞表面タンパク質に対する結合を提供し、帯電ポリマーであるポリペプチドドメインは、核酸ペイロードと共に凝縮され、及び／又は、タンパク質ペイロードと静電相互作用する）、ペイロードへとコンジュゲートされたターゲティングリガンド（例．ペプチドであるターゲティングリガンド）（ここで、ターゲティングリガンドは細胞表面タンパク質に対する結合を提供する）を含みうるがこれらに限定されない。

【００４５】

一部の場合、送達媒体は水中油中水エマルジョン粒子である。一部の場合、送達媒体は水中油エマルジョンミセル粒子である。一部の場合、送達媒体は多重膜型水中油中水エマ

ルジョン粒子である。一部の場合、送達媒体は多層型粒子である。一部の場合、送達媒体はＤＮＡオリガミナノボットである。上記のいずれの場合も、ペイロード（核酸及び／又はタンパク質）は、核酸相補対として共有結合して、又は粒子の水相内において、粒子の内部にありうる。一部の場合、送達媒体は、ターゲティングリガンド、例えば一部の場合、水中油中水エマルジョン粒子、水中油エマルジョンミセル粒子、多重膜型水中油中水エマルジョン粒子、多層型粒子又はＤＮＡオリガミナノボットをコーティングするターゲティングリガンド（本明細書の別の箇所でより詳細に説明する）を含む。一部の場合、送達媒体は金属粒子のコアを有し、ペイロード（例えばドナーＤＮＡ及び／又は部位特異的ヌクレアーゼ（又はこれをコードする核酸））は金属コアとコンジュゲートしていても（共有結合的に結合していても）よい。

【００４６】

ナノ粒子

本発明のナノ粒子は、核酸及び／又はタンパク質から作られうるペイロードを含む。例えば一部の場合、本発明のナノ粒子は核酸ペイロード（例．ＤＮＡ及び／又はＲＮＡ）を送達するのに使用される。一部の場合、ナノ粒子のコアはペイロードを含む。一部のこのような場合、ナノ粒子のコアはまた、アニオン性ポリマー組成物、カチオン性ポリマー組成物及びカチオン性ポリペプチド組成物も含みうる。一部の場合、ナノ粒子は金属粒子のコアを有し、ペイロードはコアと会合する（一部の場合にこれと、例えばこの外部とコンジュゲートする）。一部の態様では、ペイロードはナノ粒子のコアの一部である。したがって、本発明のナノ粒子のコアは、核酸、ＤＮＡ、ＲＮＡ及び／又はタンパク質を含みうる。したがって一部の場合、本発明のナノ粒子は核酸（ＤＮＡ及び／又はＲＮＡ）及びタンパク質を含む。一部の場合、本発明のナノ粒子のコアはリボ核タンパク質（ＲＮＡ及びタンパク質の）複合体を含む。一部の場合、本発明のナノ粒子のコアはデオキシリボヌクレオタンパク質（ＤＮＡ及びタンパク質（例．ドナーＤＮＡ及びＺＦＮ、ＴＡＬＥＮ又はＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエフェクタータンパク質））複合体を含む。一部の場合、本発明のナノ粒子のコアは、リボ－デオキシリボヌクレオタンパク質（ＲＮＡ、ＤＮＡ及びタンパク質（例．ガイドＲＮＡ、ドナーＤＮＡ及びＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエフェクタータンパク質））複合体を含む。一部の場合、本発明のナノ粒子のコアはＰＮＡを含む。一部の場合、本発明のコアはＰＮＡ及びＤＮＡを含む。

【００４７】

本発明の核酸ペイロード（例．ドナーＤＮＡ及び／又は配列特異的ヌクレアーゼをコードする核酸）はモルホリノ骨格構造を含みうる。一部の場合、本発明の核酸ペイロード（例．ドナーＤＮＡ及び／又は配列特異的ヌクレアーゼをコードする核酸）は１つ以上のロック核酸（ＬＮＡ）を有しうる。適切な糖置換基は、メトキシ（－Ｏ－CH_3）、アミノプロポキシ（－$OCH_2CH_2CH_2NH_2$）、アリル（－CH_2－ＣＨ＝CH_2）、－Ｏ－アリル（－Ｏ－CH_2－ＣＨ＝CH_2）及びフルオロ（Ｆ）を含む。2’-糖置換基はアラビノ位（上）にあってもよく、リボ位（下）にあってもよい。適切な塩基修飾は、5-メチルシトシン（5-me-Ｃ）、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、6-メチル、アデニン及びグアニンの6-メチル及び他のアルキル誘導体、アデニン及びグアニンの2-プロピル及び他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン、2-チオシトシン、5-ハロウラシル及びシトシン、5-プロピニル（－Ｃ＝Ｃ－CH_3）ウラシル及びシトシン、ピリミジン塩基の他のアルキニル誘導体、6-アゾウラシル、シトシン、及びチミン、5-ウラシル（シュードウラシル）、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシル及び他の8-置換アデニン及びグアニン、5-ハロ、特に、5-ブロモ、5-トリフルオロメチル、及び他の5-置換ウラシル及びシトシン、7-メチルグアニン、7-メチルアデニン、2-F-アデニン、2-アミノ-アデニン、8-アザグアニン、8-アザアデニン、7-デアザグアニン、7-デアザアデニン、3-デアザグアニン並びに3-デアザアデニンのような、合成及び天然ヌクレオ塩基を含む。さらなる修飾ヌクレオ塩基は、フェノキサジンシチジン（1H-ピリミド(5,4-b)(1,4)ベンゾキサジン-2(3H)-オン）、フェノチアジンシチジン（1H-ピリミド(5,4-b)(1,4)ベンゾチアジン-2

(3H)-オン）、置換フェノキサジンシチジン（例．9-(2-アミノエトキシ)-H-ピリミド(5,4-(b)(1,4)ベンゾキサジン-2(3H)-オン）のようなＧクランプ、カルバゾールシチジン（2H-ピリミド(4,5-b)インドール-2-オン）、ピリドインドールシチジン（H-ピリド(3’,2’:4,5)ピロロ(2,3-d)ピリミジン-2-オン）といった三環式ピリミジンを含む。

【００４８】

一部の場合、核酸ペイロードはコンジュゲート部分（例えば、核酸ペイロードの活性、安定性、細胞内分布又は細胞内取込みを増強する部分）を含みうる。これらの部分又はコンジュゲートは、官能基、例えば、一級又は二級ヒドロキシル基へと共有結合したコンジュゲート基を含みうる。コンジュゲート基は、挿入剤、レポーター分子、ポリアミン、ポリアミド、ポリエチレングリコール、ポリエーテル、オリゴマーの薬力学特性を増強する基及びオリゴマーの薬物動態特性を増強する基を含むが、これらに限定されない。適切なコンジュゲート基は、コレステロール、脂質、リン脂質、ビオチン、フェナジン、葉酸、フェナントリジン、アントラキノン、アクリジン、フルオレセイン、ローダミン、クマリン及び染料を含むが、これらに限定されない。薬力学特性を増強する基は、取込みを改善し、分解への抵抗性を増強し、及び／又は標的核酸との配列特異的ハイブリダイゼーションを強化する基を含む。薬物動態特性を増強する基は、本発明の核酸の取込み、分布、代謝又は排出を改善する基を含む。

【００４９】

任意の好都合なポリヌクレオチドが、ドナーＤＮＡではない本発明の（例えば部位特異的ヌクレアーゼを送達するための）核酸ペイロードとして使用されうる。ｍＲＮＡ、ｍ１Ａ修飾ｍＲＮＡ（アデノシンの１位においてモノメチル化された）、モルホリノＲＮＡ、ペプトイド及びペプチド核酸、ｃＤＮＡ、ＤＮＡオリガミ、合成ヌクレオチドを伴うＤＮＡ及びＲＮＡ、所定の二次構造を伴うＤＮＡ及びＲＮＡ、並びに前出の分子種のマルチマー及びオリゴマーを含む、ＲＮＡ及びＤＮＡの分子種が例として挙げられるが、これらに限定されない。

【００５０】

一部の態様では、１を超えるペイロードが同じパッケージ（例．ナノ粒子）の一部として送達され、例えば一部の場合、異なるペイロードは異なるコアの一部である。複数のペイロードを同じ送達媒体（例．ナノ粒子）の一部として送達することの１つの利点は、各ペイロードの効率が低下しないことである。例として述べると、ペイロードＡ及びペイロードＢが２つの別個のパッケージ／媒体（それぞれ、パッケージＡ及びパッケージＢ）により送達される場合、効率は乗算的で、例えば、パッケージＡ及びパッケージＢが各々１％のトランスフェクション効率を有する場合、ペイロードＡ及びペイロードＢを同じ細胞に送達する見込みは０．０１％（１％×１％）である。しかし、ペイロードＡ及びペイロードＢがいずれも同じ送達媒体の一部として送達される場合、ペイロードＡ及びペイロードＢを同じ細胞に送達する見込みは１％であり、０．０１％に対して１００倍の改善である。

【００５１】

同様に、パッケージＡ及びパッケージＢが各々０．１％のトランスフェクション効率を有する状況では、ペイロードＡ及びペイロードＢを同じ細胞に送達する見込みは０．０００１％（０．１％×０．１％）である。しかし、この状況では、ペイロードＡ及びペイロードＢがいずれも同じパッケージ（例．同じナノ粒子の一部（パッケージＡ）の一部）として送達される場合、ペイロードＡ及びペイロードＢを同じ細胞に送達する見込みは０．１％であり、０．０００１％に対して１０００倍の改善である。

【００５２】

このように、一部の態様では、（例えば上述した）１つ以上の遺伝子編集ツール及びドナーＤＮＡは、タンパク質（及び／又はこれをコードするＤＮＡ若しくはｍＲＮＡ）、及び／又はゲノム編集効率を増大させる非コードＲＮＡと組み合わせて（例えば同じナノ粒子の一部として）送達される。一部の場合、（例えば上述した）１つ以上の遺伝子編集ツール及びドナーＤＮＡは、タンパク質（及び／又はこれをコードするＤＮＡ若しくはｍＲ

ＮＡ）、並びに／又は細胞の分裂及び／若しくは分化を制御する非コードＲＮＡと組み合わせて（例えば同じナノ粒子の一部として）送達される。

【００５３】

上記の非限定的な例として述べると、一部の態様では、１つ以上の遺伝子編集ツール及びドナーＤＮＡは、ＳＣＦ（及び／又はＳＣＦをコードするＤＮＡ若しくはｍＲＮＡ）、ＨｏｘＢ４（及び／又はＨｏｘＢ４をコードするＤＮＡ若しくはｍＲＮＡ）、ＢＣＬ－ＸＬ（及び／又はＢＣＬ－ＸＬをコードするＤＮＡ若しくはｍＲＮＡ）、ＳＩＲＴ６（及び／又はＳＩＲＴ６をコードするＤＮＡ若しくはｍＲＮＡ）、ｍｉＲ－１５５を抑制する核酸分子（例．ｓｉＲＮＡ及び／又はＬＮＡ）、ｋｕ７０の発現を低減する核酸分子（例．ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、マイクロＲＮＡ）及びｋｕ８０の発現を低減する核酸分子（例．ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、マイクロＲＮＡ）のうちの１つ又は複数と組み合わせて送達されうる。

【００５４】

遺伝子編集ツール（例．部位特異的ヌクレアーゼ）及びドナーＤＮＡと組み合わせて送達されうるマイクロＲＮＡ遺伝子の例については、図９Ａを参照。例えば以下のマイクロＲＮＡは、以下の目的で使用されうる：多能性幹細胞の外胚葉系統への分化を遮断する目的で：ｍｉＲ－４３０／４２７／３０２（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0000738、MI0000772、MI0000773、MI0000774、MI0006417、MI0006418、MI0000402、MI0003716、MI0003717及びMI0003718）；多能性幹細胞の内胚葉系統への分化を遮断する目的で：ｍｉＲ－１０９及び／又はｍｉＲ－２４（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0000080、MI0000081、MI0000231及びMI0000572）；多能性幹細胞の内胚葉系統への分化を駆動する目的で：ｍｉＲ－１２２（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0000442及びMI0000256）及び／又はｍｉＲ－１９２（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0000234及びMI0000551）；外胚葉前駆細胞の角化細胞への分化を駆動する目的で：ｍｉＲ－２０３（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0000283、MI0017343及びMI0000246）；神経堤幹細胞の平滑筋への分化を駆動する目的で：ｍｉＲ－１４５（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0000461、MI0000169及びMI0021890）；神経幹細胞のグリア細胞及び／又はニューロンへの分化を駆動する目的で：ｍｉＲ－９（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0000466、MI0000467、MI0000468、MI0000157、MI0000720及びMI0000721）及び／又はｍｉＲ－１２４ａ（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0000443、MI0000444、MI0000445、MI0000150、MI0000716及びMI0000717）；中胚葉前駆細胞の軟骨細胞への分化を遮断する目的で：ｍｉＲ－１９９ａ（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0000242、MI0000281、MI0000241及びMI0000713）；中胚葉前駆細胞の骨芽細胞への分化を駆動する目的で：ｍｉＲ－２９６（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0000747及びMI0000394）及び／又はｍｉＲ－２８６１（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0013006及びMI0013007）；中胚葉前駆細胞の心筋への分化を駆動する目的で：ｍｉＲ－１（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0000437、MI0000651、MI0000139、MI0000652、MI0006283）；中胚葉前駆細胞の心筋への分化を遮断する目的で：ｍｉＲ－１３３（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0000450、MI0000451、MI0000822、MI0000159、MI0000820、MI0000821及びMI0021863）；中胚葉前駆細胞の骨格筋への分化を駆動する目的で：ｍｉＲ－２１４（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0000290及びMI0000698）、ｍｉＲ－２０６（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0000490及びMI0000249）、ｍｉＲ－１及び／又はｍｉＲ－２６ａ（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0000083、MI0000750、MI0000573及びMI0000706）；中胚葉前駆細胞の骨格筋への分化を遮断する目的で：ｍｉＲ－１３３（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0000450、MI0000451、MI0000822、MI0000159、MI0000820、MI0000821及びMI0021863）、ｍｉＲ－２２１（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0000298及びMI0000709）、及び／又はｍｉＲ－２２２（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0000299及びMI0000710）；造血前駆細胞の分化を駆動する目的で：ｍｉＲ－２２３（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0000300及びMI0000703）；造血前駆細胞の分化を遮断する目的で：ｍｉＲ－１２８ａ（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0000447及びMI0000155）及び／又はｍｉＲ－１８１ａ（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0000269、MI0000289、MI0000223及びMI0000697）；造血前駆細胞のリンパ系前駆細胞への分化を駆動する目的で：ｍ

ｉＲ－１８１（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0000269、MI0000270、MI0000271、MI0000289、MI0000683、MI0003139、MI0000223、MI0000723、MI0000697、MI0000724、MI0000823及びMI0005450）；造血前駆細胞のリンパ系前駆細胞への分化を遮断する目的で：ｍｉＲ－１４６（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0000477、MI0003129、MI0003782、MI0000170及びMI0004665）；造血前駆細胞の骨髄系前駆細胞への分化を遮断する目的で：ｍｉＲ－１５５、ｍｉＲ－２４ａ及び／又はｍｉＲ－１７（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0000071及びMI0000687）；リンパ系前駆細胞のＴ細胞への分化を駆動する目的で：ｍｉＲ－１５０（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0000479及びMI0000172）；骨髄系前駆細胞の顆粒球への分化を遮断する目的で：ｍｉＲ－２２３（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0000300及びMI0000703）；骨髄系前駆細胞の単球への分化を遮断する目的で：ｍｉＲ－１７－５ｐ（例．ＭｉＲベース受託番号：MIMAT0000070及びMIMAT0000649）、ｍｉＲ－２０ａ（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0000076及びMI0000568）、及び／又はｍｉＲ－１０６ａ（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0000113及びMI0000406）；骨髄系前駆細胞の赤血球への分化を遮断する目的で：ｍｉＲ－１５０（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0000479及びMI0000172）、ｍｉＲ－１５５、ｍｉＲ－２２１（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0000298及びMI0000709）、及び／又はｍｉＲ－２２２（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0000299及びMI0000710）；かつ骨髄系前駆細胞の赤血球への分化を駆動する目的で：ｍｉＲ－４５１（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0001729、MI0017360、MI0001730及びMI0021960）及び／又はｍｉＲ－１６（例．ＭｉＲベース受託番号：MI0000070、MI0000115、MI0000565及びMI0000566）。

【００５５】

遺伝子編集ツール及びドナーＤＮＡと組み合わせて（例えばタンパク質として、又はタンパク質をコードするＤＮＡ若しくはＲＮＡとして）送達されうるシグナル伝達タンパク質（例．細胞外シグナル伝達タンパク質）の例については、図９Ｂを参照。同じタンパク質は、例えば、ナノ粒子を受け取る標的細胞における分化にバイアスをかける目的で、ターゲティングリガンドと同様に、本発明のナノ粒子の外殻の一部としても使用されうる。例えば以下のシグナル伝達タンパク質（例．細胞外シグナル伝達タンパク質）は以下の目的で使用されうる：造血幹細胞のリンパ系共通前駆細胞系統への分化を駆動する目的で：ＩＬ－７（例．NCBI Gene ID：3574）；造血幹細胞の骨髄系共通前駆細胞系統への分化を駆動する目的で：ＩＬ－３（例．NCBI Gene ID：3562）、ＧＭ－ＣＳＦ（例．NCBI Gene ID：1437）及び／又はＭ－ＣＳＦ（例．NCBI Gene ID：1435）；リンパ系共通前駆細胞のＢ細胞への分化を駆動する目的で：ＩＬ－３、ＩＬ－４（例．NCBI Gene ID：3565）及び／又はＩＬ－７；リンパ系共通前駆細胞のナチュラルキラー細胞への分化を駆動する目的で：ＩＬ－１５（例．NCBI Gene ID：3600）；リンパ系共通前駆細胞のＴ細胞への分化を駆動する目的で：ＩＬ－２（例．NCBI Gene ID：3558）、ＩＬ－７及び／又はＮｏｔｃｈ（例．NCBI Gene ID：4851、4853、4854、4855）；リンパ系共通前駆細胞の樹状細胞への分化を駆動する目的で：Ｆｌｔ－３リガンド（例．NCBI Gene ID：2323）；骨髄系共通前駆細胞の樹状細胞への分化を駆動する目的で：Ｆｌｔ－３リガンド、ＧＭ－ＣＳＦ及び／又はＴＮＦα（例．NCBI Gene ID：7124）；骨髄系共通前駆細胞の顆粒球マクロファージ前駆細胞系統への分化を駆動する目的で：ＧＭ－ＣＳＦ；骨髄系共通前駆細胞の巨核細胞－赤血球系前駆細胞系統への分化を駆動する目的で：ＩＬ－３、ＳＣＦ（例．NCBI Gene ID：4254）及び／又はＴｐｏ（例．NCBI Gene ID：7173）；巨核細胞－赤血球系前駆細胞の巨核細胞への分化を駆動する目的で：ＩＬ－３、ＩＬ－６（例．NCBI Gene ID：3569）、ＳＣＦ及び／又はＴｐｏ；巨核細胞－赤血球系前駆細胞の赤血球への分化を駆動する目的で：エリスロポエチン（例．NCBI Gene ID：2056）；巨核細胞の血小板への分化を駆動する目的で：ＩＬ－１１（例．NCBI Gene ID：3589）及び／又はＴｐｏ；顆粒球マクロファージ前駆細胞の単球系統への分化を駆動する目的で：ＧＭ－ＣＳＦ及び／又はＭ－ＣＳＦ；顆粒球マクロファージ前駆細胞の骨芽細胞系統への分化を駆動する目的で：ＧＭ－ＣＳＦ；単球の単球由来樹状細胞への分化を駆動する目的で：Ｆｌｔ－３リガンド、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＦＮα（例．NCBI Gene ID：3439）及び／又はＩＬ－４；単球のマクロファージへの分化を駆動する目的で：ＩＦＮγ、ＩＬ－６、ＩＬ－１０（例．NCBI Gene ID：35

86）及び／又はＭ－ＣＳＦ；骨芽細胞の好中球への分化を駆動する目的で：Ｇ－ＣＳＦ（例．NCBI Gene ID：1440）、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－６及び／又はＳＣＦ；骨芽細胞の好酸球への分化を駆動する目的で：ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－３及び／又はＩＬ－５（例．NCBI Gene ID：3567）；かつ骨芽細胞の好塩基球への分化を駆動する目的で：Ｇ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦ及び／又はＩＬ－３。

【００５６】

遺伝子編集ツール及びドナーＤＮＡと組み合わせて（例えばタンパク質及び／又はタンパク質をコードする核酸（例．ＤＮＡ又はＲＮＡ）として）送達されうるタンパク質の例は、ＳＯＸ１７、ＨＥＸ、ＯＳＫＭ（Ｏｃｔ４／Ｓｏｘ２／Ｋｌｆ４／ｃ－ｍｙｃ）及び／又はｂＦＧＦ（例えば肝幹細胞系統への分化を駆動する）；ＨＮＦ４ａ（例えば肝細胞への分化を駆動する）；Ｐｏｌｙ（Ｉ：Ｃ）、ＢＭＰ－４、ｂＦＧＦ及び／又は８－Ｂｒ－ｃＡＭＰ（例えば内皮幹細胞／前駆細胞系統への分化を駆動する）；ＶＥＧＦ（例えば動脈内皮への分化を駆動する）；Ｓｏｘ－２、Ｂｒｎ４、Ｍｙｔ１ｌ、Ｎｅｕｒｏｄ２、Ａｓｃｌ１（例えば神経幹細胞／前駆細胞系統への分化を駆動する）；並びにＢＤＮＦ、ＦＣＳ、ホルスコリン及び／又はＳＨＨ（例えば、ニューロン、星状細胞及び／又は希突起膠細胞への分化を駆動する）を含むが、これらに限定されない。

【００５７】

遺伝子編集ツール及びドナーＤＮＡと組み合わせて（例えばタンパク質及び／又はタンパク質をコードする核酸、例えばＤＮＡ又はＲＮＡとして）送達されうるシグナル伝達タンパク質（例．細胞外シグナル伝達タンパク質）の例は、サイトカイン（例えばＣＤ８＋Ｔ細胞を活性化させるための、例えばＩＬ－及び／又はＩＬ－１５）；Ｎｏｔｃｈ、Ｗｎｔ及び／又はＳｍａｄシグナル伝達経路のうちの１つ又は複数をモジュレートするリガンド及び／又はシグナル伝達タンパク質；ＳＣＦ；幹細胞プログラム化因子（例．Ｓｏｘ２、Ｏｃｔ３／４、Ｎａｎｏｇ、Ｋｌｆ４、ｃ－Ｍｙｃなど）；並びに、その後の単離／精製／濃縮のための一時的表面マーカー「タグ」及び／又は蛍光レポーターを含むが、これらに限定されない。例えば線維芽細胞はＳｏｘ２の送達を介して神経幹細胞に転換されうるが、Ｏｃｔ３／４及び低分子である「後成的リセット因子」の存在下では心筋細胞になるであろう。ハンチントン病又はＣＸＣＲ４突然変異を伴う患者では、これらの線維芽細胞は、それぞれ、ニューロン及び心臓細胞と関連する罹患表現型形質をコードしうる。遺伝子編集補正及びこれらの因子を単一のパッケージ内で送達することにより、導入される因子／ペイロードの全てではないが、これらの１つ以上に起因する有害作用の危険性が著明に低減されうる。

【００５８】

ペイロード放出のタイミング及び／又は場所は制御されうる（本明細書の別の箇所でより詳細に説明する）ため、複数のペイロードの同じパッケージ（例．同じナノ粒子）内のパッケージングは、異なるペイロードについて異なる放出時間／速度及び／又は場所を達成することを妨げない。例えば上記のタンパク質（及び／又はこれらをコードするＤＮＡ若しくはｍＲＮＡ）及び／又は非コードＲＮＡの放出は、同じパッケージの一部である１つ以上の遺伝子編集ツールの放出と別個に制御されうる。例えば細胞の増殖及び／又は分化を制御するタンパク質及び／又は核酸（例．ＤＮＡ、ｍＲＮＡ、非コードＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ）は、１つ以上の遺伝子編集ツールより早く放出される場合もあり、１つ以上の遺伝子編集ツールより遅く放出される場合もある。これは、例えば、１つを超える脱落層を使用することにより達成される場合もあり、及び／又は、１つを超えるコア（例えば１つのコアが他のコアと異なる放出プロファイルを有する場合、例えば異なるD-異性体対L-異性体の比を使用する場合、異なるＥＳＰ：ＥＮＰ：ＥＰＰプロファイルを使用する場合など）を使用することにより達成される場合もある。このようにして、ドナー及びヌクレアーゼは最適の編集及び挿入効率を可能とする段階的な方式で放出されうる。

【００５９】

ナノ粒子のコア

本発明のナノ粒子のコアは、アニオン性ポリマー組成物（例．ポリ（グルタミン酸））

、カチオン性ポリマー組成物（例．ポリ（アルギニン））、カチオン性ポリペプチド組成物（例．ヒストンテールペプチド）及びペイロード（例．核酸及び／又はタンパク質のペイロード、例えば、ドナーＲＮＡ及び／又は部位特異的ヌクレアーゼ若しくは部位特異的ヌクレアーゼをコードする核酸）を含みうる。一部の場合、コアはアニオン性アミノ酸ポリマーの存在下における（かつ一部の場合、カチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチドの存在下における）カチオン性アミノ酸ポリマー及びペイロードの凝縮により生成される。一部の態様では、コアを構成する構成要素の凝縮は、カチオン性ポリマーのペイロードとのコンジュゲートと比較したトランスフェクション効率の増大を媒介しうる。アニオン性ポリマーのナノ粒子のコアへの組入れは、細胞内のナノ粒子の滞留及びペイロード放出の持続時間を延長しうる。

【００６０】

コアのカチオン性及びアニオン性ポリマー組成物について、ペイロードの徐放を制御するためにD-異性体ポリマー対L-異性体ポリマーの比が制御されうるが、ここで、D-異性体ポリマー対L-異性体ポリマーの比の増大は安定性の増大（ペイロード放出速度の低減）をもたらし、これは、例えば、本発明のナノ粒子により送達されるペイロードからの長時間持続型の遺伝子発現を可能としうる。一部の場合、ナノ粒子のコア内のD-異性体ポリペプチド対L-異性体ポリペプチドの比の改変は、遺伝子発現プロファイル（例えばペイロード分子によりコードされるタンパク質の発現）が、１～９０日間（例．１～８０、１～７０、１～６０、１～５０、１～４０、１～３０、１～２５、１～２０、１～１５、１～１０、３～９０、３～８０、３～７０、３～６０、３～５０、３～４０、３～３０、３～２５、３～２０、３～１５、３～１０、５～９０、５～８０、５～７０、５～６０、５～５０、５～４０、５～３０、５～２５、５～２０、５～１５又は５～１０日間）のオーダーにあるように仕向けうる。（例えば、遺伝子編集ツールを送達する場合の）ペイロード放出の制御は、例えば一部の場合、相同性指向修復が所望される場合、ゲノム編集を実施するために特に効果的でありうる。

【００６１】

一部の態様では、ナノ粒子は、コア及びコアを封入する脱落層を含み、ここで、コアは、（ａ）アニオン性ポリマー組成物；（ｂ）カチオン性ポリマー組成物；（ｃ）カチオン性ポリペプチド組成物；並びに（ｄ）核酸及び／又はタンパク質のペイロードを含み、ここで、（ａ）及び（ｂ）のうちの一方は、アミノ酸のD-異性体ポリマーを含み、（ａ）及び（ｂ）のうちの他方は、アミノ酸のL-異性体ポリマーを含み、ここで、D-異性体ポリマー対L-異性体ポリマーの比は、１０：１～１．５：１（例．８：１～１．５：１、６：１～１．５：１、５：１～１．５：１、４：１～１．５：１、３：１～１．５：１、２：１～１．５：１、１０：１～２：１；８：１～２：１、６：１～２：１、５：１～２：１、１０：１～３：１；８：１～３：１、６：１～３：１、５：１～３：１、１０：１～４：１；４：１～２：１、６：１～４：１又は１０：１～５：１）又は１：１．５～１：１０（例．１：１．５～１：８、１：１．５～１：６、１：１．５～１：５、１：１．５～１：４、１：１．５～１：３、１：１．５～１：２、１：２～１：１０、１：２～１：８、１：２～１：６、１：２～１：５、１：２～１：４、１：２～１：３、１：３～１：１０、１：３～１：８、１：３～１：６、１：３～１：５、１：４～１：１０、１：４～１：８、１：４～１：６又は１：５～１：１０）である。一部のこのような場合には、D-異性体ポリマー対L-異性体ポリマーの比は１：１ではない。一部のこのような場合には、アニオン性ポリマー組成物は、ポリ（D-グルタミン酸）（ＰＤＥＡ）及びポリ（D-アスパラギン酸）（ＰＤＤＡ）から選択されるアニオン性ポリマーを含み、ここで（任意に）、カチオン性ポリマー組成物は、ポリ（L-アルギニン）、ポリ（L-リシン）、ポリ（L-ヒスチジン）、ポリ（L-オルニチン）、及びポリ（L-シトルリン）から選択されるカチオン性ポリマーを含みうる。一部の場合、カチオン性ポリマー組成物は、ポリ（D-アルギニン）、ポリ（D-リシン）、ポリ（D-ヒスチジン）、ポリ（D-オルニチン）、及びポリ（D-シトルリン）から選択されるカチオン性ポリマーを含み、ここで（任意に）、アニオン性ポリマー組成物は、ポリ（L-グルタミン酸）（ＰＬＥＡ）及びポリ（L-アスパラギン酸）（ＰＬＤ

Ａ）から選択されるアニオン性ポリマーを含みうる。

【００６２】

一部の態様では、ナノ粒子は、コア及びコアを封入する脱落層を含み、ここで、コアは、（ｉ）アニオン性ポリマー組成物；（ｉｉ）カチオン性ポリマー組成物；（ｉｉｉ）カチオン性ポリペプチド組成物；並びに（ｉｖ）核酸及び／又はタンパク質のペイロードを含み、この場合、（ａ）前記アニオン性ポリマー組成物は、アニオン性アミノ酸のD-異性体のポリマー、及びアニオン性アミノ酸のL-異性体のポリマーを含み；並びに／又は（ｂ）前記カチオン性ポリマー組成物は、カチオン性アミノ酸のD-異性体のポリマー、及びカチオン性アミノ酸のL-異性体のポリマーを含む。一部のこのような場合には、アニオン性ポリマー組成物は、ポリ（D-グルタミン酸）（ＰＤＥＡ）及びポリ（D-アスパラギン酸）（ＰＤＤＡ）から選択される第１のアニオン性ポリマーを含み；ポリ（L-グルタミン酸）（ＰＬＥＡ）及びポリ（L-アスパラギン酸）（ＰＬＤＡ）から選択される第２のアニオン性ポリマーを含む。一部の場合、カチオン性ポリマー組成物は、ポリ（D-アルギニン）、ポリ（D-リシン）、ポリ（D-ヒスチジン）、ポリ（D-オルニチン）及びポリ（D-シトルリン）から選択される第１のカチオン性ポリマーを含み；ポリ（L-アルギニン）、ポリ（L-リシン）、ポリ（L-ヒスチジン）、ポリ（L-オルニチン）及びポリ（L-シトルリン）から選択される第２のカチオン性ポリマーを含む。一部の場合、アニオン性アミノ酸のD-異性体のポリマーは、アニオン性アミノ酸の前記L-異性体のポリマーと比べて、１０：１～１：１０の比で存在する。一部の場合、カチオン性アミノ酸のD-異性体のポリマーは、カチオン性アミノ酸の前記L-異性体のポリマーと比べて、１０：１～１：１０の比で存在する。

【００６３】

ナノ粒子の構成要素（タイミング）

一部の態様では、ペイロード放出のタイミングは、特定の種類のタンパク質を、例えばコアの一部（例．カチオン性ポリペプチド組成物の一部、カチオン性ポリマー組成物の一部、及び／又はアニオン性ポリマー組成物の一部）として選択することにより制御されうる。例えば、特定の時間、又はペイロードが特定の細胞内の場所（例．細胞質ゾル、核、リソソーム、エンドソーム）にたどり着くまで、又は特定の条件下（例．低ｐＨ、高ｐＨなど）、ペイロードの放出を遅らせることが望ましい場合がある。このように一部の場合、特異的タンパク質活性（例．酵素活性）に対して感受性である、例えば特異的タンパク質活性（例．酵素活性）に対する基質であるタンパク質が（例えばコアの一部として）使用されるが、これは、一般的な遍在的細胞内機構、例えば、一般的な分解機構に対して感受性であることと対照的である。本明細書では、特異的タンパク質活性に対して感受性であるタンパク質は「酵素感受性タンパク質」（ＥＳＰ）という。ＥＳＰの代表的な例は、（ｉ）マトリックスメタロプロテイナーゼ（ＭＭＰ）活性（細胞外活性の例）に対する基質であるタンパク質、例えばＭＭＰにより認識されるモチーフを含むタンパク質；（ｉｉ）カテプシン活性（細胞内エンドソーム活性の例）に対する基質であるタンパク質、例えば、カテプシンにより認識されるモチーフを含むタンパク質；並びに（ｉｉｉ）メチルトランスフェラーゼ及び／又はアセチルトランスフェラーゼ活性（細胞内核活性の例）に対する基質であるタンパク質、例えば、ヒストンテールペプチド（ＨＴＰ）、例えば、酵素的にメチル化／脱メチル化されうるモチーフ、及び／又は酵素的にアセチル化／脱アセチル化されうるモチーフを含むタンパク質、を含むが、これらに限定されない。例えば一部の場合、核酸ペイロードは、アセチルトランスフェラーゼ活性に対する基質であるタンパク質（例．ヒストンテールペプチド）と共に凝縮され、タンパク質のアセチル化はタンパク質にペイロードを放出させる（このように、アセチル化に対する感受性が大きい又は小さいタンパク質の使用を選び出すことにより、ペイロード放出に対して制御を施すことができる）。

【００６４】

一部の場合、本発明のナノ粒子のコアは、ポリペプチドホモポリマー（すなわち、リピート配列を有するタンパク質）である酵素中性ポリペプチド（ＥＮＰ）を含み、この場合

、ポリペプチドは特定の活性を有さず、中性である。例えば、いずれも特定の活性を有するＮＬＳ配列及びＨＴＰと異なり、ＥＮＰは特定の活性を有さない。

【００６５】

一部の場合、本発明のナノ粒子のコアは、酵素活性に対して抵抗性であるタンパク質である酵素保護ポリペプチド（ＥＰＰ）を含む。ＥＰＰの例は、（ｉ）タンパク質分解に抵抗しうる、D-異性体アミノ酸（例．D-異性体ポリマー）を含むポリペプチド；及び（ｉｉ）セルフシェルタリングドメイン、例えばポリグルタミンリピートドメイン（例．ＱＱＱＱＱＱＱＱＱＱ（配列番号１７０））を含むが、これらに限定されない。

【００６６】

本発明のナノ粒子の一部（例．ナノ粒子のコアの一部）である感受性タンパク質（ＥＳＰ）、中性タンパク質（ＥＮＰ）及び保護タンパク質（ＥＰＰ）の相対量を制御することにより、ペイロードの放出を制御しうる。例えば多くのＥＳＰの使用は、一般に多くのＥＰＰの使用より迅速なペイロードの放出をもたらしうる。加えて、多くのＥＳＰの使用は、一般に特定の条件／状況のセット、例えばＥＳＰが感受性であるタンパク質（例．酵素）の活性をもたらす状態／状況に依存するペイロードの放出をもたらす。

【００６７】

ナノ粒子のアニオン性ポリマー組成物

アニオン性ポリマー組成物は、１つ以上のアニオン性アミノ酸ポリマーを含みうる。例えば一部の場合、本発明のアニオン性ポリマー組成物は、ポリ（グルタミン酸）（ＰＥＡ）、ポリ（アスパラギン酸）（ＰＤＡ）及びこれらの組合せから選択されるポリマーを含む。一部の場合、所与のアニオン性アミノ酸ポリマーは、アスパラギン酸残基とグルタミン酸残基のミックスを含みうる。各ポリマーは、組成物中でL-異性体のポリマーとして存在する場合もあり、D-異性体のポリマーとして存在する場合もあり、ここで、D-異性体は分解に長くかかるため、標的細胞内でより安定である。したがって、D-異性体のポリ（アミノ酸）のナノ粒子のコアへの組入れは、コアの分解、及び、その後のペイロード放出を遅らせる。したがって、ペイロード放出速度は制御される場合があり、D-異性体のポリマー対L-異性体のポリマーの比に比例し、ここで、D-異性体対L-異性体の比は、ペイロード放出の持続時間を増大させる（すなわち、放出速度を減少させる）。言い換えれば、D-異性体とL-異性体との相対量は、ナノ粒子のコアの徐放動態、並びに分解への酵素感受性及びペイロード放出を調節しうる。

【００６８】

一部の場合、本発明のナノ粒子のアニオン性ポリマー組成物は、アニオン性アミノ酸ポリマーのD-異性体のポリマー及びL-異性体のポリマー（例．ポリ（グルタミン酸）（ＰＥＡ）及びポリ（アスパラギン酸）（ＰＤＡ））を含む。一部の場合、D-異性体対L-異性体の比は、１０：１～１：１０（例．８：１～１：１０、６：１～１：１０、４：１～１：１０、３：１～１：１０、２：１～１：１０、１：１～１：１０、１０：１～１：８、８：１～１：８、６：１～１：８、４：１～１：８、３：１～１：８、２：１～１：８、１：１～１：８、１０：１～１：６、８：１～１：６、６：１～１：６、４：１～１：６、３：１～１：６、２：１～１：６、１：１～１：６、１０：１～１：４、８：１～１：４、６：１～１：４、４：１～１：４、３：１～１：４、２：１～１：４、１：１～１：４、１０：１～１：３、８：１～１：３、６：１～１：３、４：１～１：３、３：１～１：３、２：１～１：３、１：１～１：３、１０：１～１：２、８：１～１：２、６：１～１：２、４：１～１：２、３：１～１：２、２：１～１：２、１：１～１：２、１０：１～１：１、８：１～１：１、６：１～１：１、４：１～１：１、３：１～１：１又は２：１～１：１）である。

【００６９】

したがって一部の場合、アニオン性ポリマー組成物は、D-異性体（例えばポリ（D-グルタミン酸）（ＰＤＥＡ）及びポリ（D-アスパラギン酸）（ＰＤＤＡ）から選択される）のポリマーである第１のアニオン性ポリマー（例．アミノ酸ポリマー）を含み；L-異性体（例えばポリ（L-グルタミン酸）（ＰＬＥＡ）及びポリ（L-アスパラギン酸）（ＰＬＤＡ）

から選択される）のポリマーである第２のアニオン性ポリマー（例．アミノ酸ポリマー）を含む。一部の場合、第１のアニオン性ポリマー（D-異性体）対第２のアニオン性ポリマー（L-異性体）の比は、１０：１～１：１０（例．８：１～１：１０、６：１～１：１０、４：１～１：１０、３：１～１：１０、２：１～１：１０、１：１～１：１０、１０：１～１：８、８：１～１：８、６：１～１：８、４：１～１：８、３：１～１：８、２：１～１：８、１：１～１：８、１０：１～１：６、８：１～１：６、６：１～１：６、４：１～１：６、３：１～１：６、２：１～１：６、１：１～１：６、１０：１～１：４、８：１～１：４、６：１～１：４、４：１～１：４、３：１～１：４、２：１～１：４、１：１～１：４、１０：１～１：３、８：１～１：３、６：１～１：３、４：１～１：３、３：１～１：３、２：１～１：３、１：１～１：３、１０：１～１：２、８：１～１：２、６：１～１：２、４：１～１：２、３：１～１：２、２：１～１：２、１：１～１：２、１０：１～１：１、８：１～１：１、６：１～１：１、４：１～１：１、３：１～１：１又は２：１～１：１）である。

【００７０】

一部の態様では、本発明のナノ粒子のコアのアニオン性ポリマー組成物は、グリコサミノグリカン、糖タンパク質、多糖、ポリ（マヌロン酸）、ポリ（グルクロン酸）、ヘパリン、硫酸ヘパリン、コンドロイチン、硫酸コンドロイチン、ケラタン、硫酸ケラタン、アグレカン、ポリ（グルコサミン）又はこれらの任意の組合せを含むアニオン性ポリマーを含む（例えば、アニオン性ポリマーの前出の例のうちのいずれかに加えて、又はこの代わりに）。

【００７１】

一部の態様では、コア内のアニオン性ポリマーは、１～２００ｋＤａ（例．１～１５０、１～１００、１～５０、５～２００、５～１５０、５～１００、５～５０、１０～２００、１０～１５０、１０～１００、１０～５０、１５～２００、１５～１５０、１５～１００又は１５～５０ｋＤａ）の分子量を有しうる。例として述べると、一部の場合、アニオン性ポリマーは分子量約１５ｋＤａのポリ（グルタミン酸）を含む。

【００７２】

一部の場合、アニオン性アミノ酸ポリマーは、例えば、リンカー、ＮＬＳ、び／又はカチオン性ポリペプチド（例．ヒストン又はＨＴＰ）とのコンジュゲーションを促進するシステイン残基を含む。例えば、システイン残基はスルフヒドリル化学反応（例．ジスルフィド結合）及び／又はアミン反応性化学反応を介する架橋（コンジュゲーション）のために使用されうる。したがって一部の態様では、アニオン性ポリマー組成物のアニオン性アミノ酸ポリマー（例．ポリ（グルタミン酸）（ＰＥＡ）、ポリ（アスパラギン酸）（ＰＤＡ）、ポリ（D-グルタミン酸）（ＰＤＥＡ）、ポリ（D-アスパラギン酸）（ＰＤＤＡ）、ポリ（L-グルタミン酸）（ＰＬＥＡ）、ポリ（L-アスパラギン酸）（ＰＬＤＡ））はシステイン残基を含む。一部の場合、アニオン性アミノ酸ポリマーはＮ及び／又はＣ末端にシステイン残基を含む。一部の場合、アニオン性アミノ酸ポリマーは内部システイン残基を含む。

【００７３】

一部の場合、アニオン性アミノ酸ポリマーは、核局在化シグナル（ＮＬＳ）（以下でより詳細に説明する）を含む（及び／又はこれとコンジュゲートする）。したがって一部の態様では、アニオン性ポリマー組成物のアニオン性アミノ酸ポリマー（例．ポリ（グルタミン酸）（ＰＥＡ）、ポリ（アスパラギン酸）（ＰＤＡ）、ポリ（D-グルタミン酸）（ＰＤＥＡ）、ポリ（D-アスパラギン酸）（ＰＤＤＡ）、ポリ（L-グルタミン酸）（ＰＬＥＡ）、ポリ（L-アスパラギン酸）（ＰＬＤＡ））は、１つ以上（例．２つ以上、３つ以上又は４つ以上）のＮＬＳを含む（及び／又はこれとコンジュゲートする）。一部の場合、アニオン性アミノ酸ポリマーは、Ｎ及び／又はＣ末端にＮＬＳを含む。一部の場合、アニオン性アミノ酸ポリマーは内部ＮＬＳを含む。

【００７４】

一部の場合、アニオン性ポリマーは、本発明のナノ粒子のコアを生成する場合に、カチ

オン性ポリマーの前に付加される。

【００７５】

ナノ粒子のカチオン性ポリマー組成物

カチオン性ポリマー組成物は１つ以上のカチオン性アミノ酸ポリマーを含みうる。例えば一部の場合、本発明のカチオン性ポリマー組成物は、ポリ（アルギニン）（ＰＲ）、ポリ（リシン）（ＰＫ）、ポリ（ヒスチジン）（ＰＨ）、ポリ（オルニチン）、ポリ（シトルリン）及びこれらの組合せから選択されるポリマーを含む。一部の場合、所与のカチオン性アミノ酸ポリマーは、アルギニン、リシン、ヒスチジン、オルニチン及びシトルリン残基（任意の好都合な組合せにおける）のミックスを含みうる。各ポリマーは、組成物中でL-異性体のポリマーとして存在する場合もあり、D-異性体のポリマーとして存在する場合もあり、ここで、D-異性体は分解に長くかかるため、標的細胞内でより安定である。したがって、D-異性体のポリ（アミノ酸）のナノ粒子のコアへの組入れは、コアの分解、及び、その後のペイロード放出を遅らせる。したがって、ペイロード放出速度は制御される場合があり、D-異性体のポリマー対L-異性体のポリマーの比に比例し、ここで、D-異性体対L-異性体の比はペイロード放出の持続時間を増大させる（すなわち、放出速度を減少させる）。言い換えれば、D-異性体とL-異性体との相対量は、ナノ粒子のコアの徐放動態、並びに分解への酵素感受性及びペイロード放出をモジュレートしうる。

【００７６】

一部の場合、本発明のナノ粒子のカチオン性ポリマー組成物は、カチオン性アミノ酸ポリマーのD-異性体のポリマー及びL-異性体のポリマー（例．ポリ（アルギニン）（ＰＲ）、ポリ（リシン）（ＰＫ）、ポリ（ヒスチジン）（ＰＨ）、ポリ（オルニチン）、ポリ（シトルリン））を含む。一部の場合、D-異性体対L-異性体の比は、１０：１～１：１０（例．８：１～１：１０、６：１～１：１０、４：１～１：１０、３：１～１：１０、２：１～１：１０、１：１～１：１０、１０：１～１：８、８：１～１：８、６：１～１：８、４：１～１：８、３：１～１：８、２：１～１：８、１：１～１：８、１０：１～１：６、８：１～１：６、６：１～１：６、４：１～１：６、３：１～１：６、２：１～１：６、１：１～１：６、１０：１～１：４、８：１～１：４、６：１～１：４、４：１～１：４、３：１～１：４、２：１～１：４、１：１～１：４、１０：１～１：３、８：１～１：３、６：１～１：３、４：１～１：３、３：１～１：３、２：１～１：３、１：１～１：３、１０：１～１：２、８：１～１：２、６：１～１：２、４：１～１：２、３：１～１：２、２：１～１：２、１：１～１：２、１０：１～１：１、８：１～１：１、６：１～１：１、４：１～１：１、３：１～１：１又は２：１～１：１）である。

【００７７】

したがって一部の場合、カチオン性ポリマー組成物は、D-異性体（例えば、ポリ（D-アルギニン）、ポリ（D-リシン）、ポリ（D-ヒスチジン）、ポリ（D-オルニチン）及びポリ（D-シトルリン）から選択される）のポリマーである第１のカチオン性ポリマー（例．アミノ酸ポリマー）を含み；L-異性体（例えば、ポリ（L-アルギニン）、ポリ（L-リシン）、ポリ（L-ヒスチジン）、ポリ（L-オルニチン）及びポリ（L-シトルリン）から選択される）のポリマーである第２のカチオン性ポリマー（例．アミノ酸ポリマー）を含む。一部の場合、第１のカチオン性ポリマー（D-異性体）対第２のカチオン性ポリマー（L-異性体）の比は、１０：１～１：１０（例．８：１～１：１０、６：１～１：１０、４：１～１：１０、３：１～１：１０、２：１～１：１０、１：１～１：１０、１０：１～１：８、８：１～１：８、６：１～１：８、４：１～１：８、３：１～１：８、２：１～１：８、１：１～１：８、１０：１～１：６、８：１～１：６、６：１～１：６、４：１～１：６、３：１～１：６、２：１～１：６、１：１～１：６、１０：１～１：４、８：１～１：４、６：１～１：４、４：１～１：４、３：１～１：４、２：１～１：４、１：１～１：４、１０：１～１：３、８：１～１：３、６：１～１：３、４：１～１：３、３：１～１：３、２：１～１：３、１：１～１：３、１０：１～１：２、８：１～１：２、６：１～１：２、４：１～１：２、３：１～１：２、２：１～１：２、１：１～１：２、１０：１～１：１、８：１～１：１、６：１～１：１、４：１～１：１、３：１～１：１又は２：

１～１：１）である。
【００７８】
一部の態様では、本発明のナノ粒子のコアのカチオン性ポリマー組成物は、ポリ（エチレンイミン）、ポリ（アミドアミン）（ＰＡＭＡＭ）、ポリ（アスパルタミド）、（例えば、コア凝縮のために「スパイダーウェブ」様分枝を形成するための）ポリペプトイド、電荷官能化ポリエステル、カチオン性多糖、アセチル化されたアミノ糖、キトサン、又はこれらの任意の組合せを含む（例えば直鎖形態又は分枝形態における）カチオン性ポリマーを含む（例えば、カチオン性ポリマーの前出の例のうちのいずれかに加えて、又はこの代わりに）。
【００７９】
一部の態様では、コア内のカチオン性ポリマーは、１～２００ｋＤａ（例．１～１５０、１～１００、１～５０、５～２００、５～１５０、５～１００、５～５０、１０～２００、１０～１５０、１０～１００、１０～５０、１５～２００、１５～１５０、１５～１００又は１５～５０ｋＤａ）の分子量を有しうる。例として述べると、一部の場合、カチオン性ポリマーは例えば分子量約２９ｋＤａの（L-アルギニン）を含む。別の例として述べると、一部の場合、カチオン性ポリマーは分子量約２５ｋＤａ（ＰＥＩ）の直鎖状ポリ（エチレンイミン）を含む。別の例として述べると、一部の場合、カチオン性ポリマーは分子量約１０ｋＤａの分枝状ポリ（エチレンイミン）を含む。別の例として述べると、一部の場合、カチオン性ポリマーは分子量約７０ｋＤａの分枝状ポリ（エチレンイミン）を含む。一部の場合、カチオン性ポリマーはＰＡＭＡＭを含む。
【００８０】
一部の場合、カチオン性アミノ酸ポリマーは、例えば、リンカー、ＮＬＳ、及び／又はカチオン性ポリペプチド（例．ヒストン又はＨＴＰ）とのコンジュゲーションを促進するシステイン残基を含む。例えば、システイン残基は、スルフヒドリル化学反応（例．ジスルフィド結合）及び／又はアミン反応性化学反応を介する架橋（コンジュゲーション）のために使用されうる。したがって一部の態様では、カチオン性ポリマー組成物のカチオン性アミノ酸ポリマー（例．ポリ（アルギニン）（ＰＲ）、ポリ（リシン）（ＰＫ）、ポリ（ヒスチジン）（ＰＨ）、ポリ（オルニチン）及びポリ（シトルリン）、ポリ（D-アルギニン）（ＰＤＲ）、ポリ（D-リシン）（ＰＤＫ）、ポリ（D-ヒスチジン）（ＰＤＨ）、ポリ（D-オルニチン）及びポリ（D-シトルリン）、ポリ（L-アルギニン）（ＰＬＲ）、ポリ（L-リシン）（ＰＬＫ）、ポリ（L-ヒスチジン）（ＰＬＨ）、ポリ（L-オルニチン）及びポリ（L-シトルリン））は、システイン残基を含む。一部の場合、カチオン性アミノ酸ポリマーはＮ及び／又はＣ末端にシステイン残基を含む。一部の場合、カチオン性アミノ酸ポリマーは内部システイン残基を含む。
【００８１】
一部の場合、カチオン性アミノ酸ポリマーは核局在化シグナル（ＮＬＳ）（以下により詳細に説明する）を含む（及び／又はこれとコンジュゲートする）。したがって一部の態様では、カチオン性ポリマー組成物のカチオン性アミノ酸ポリマー（例．ポリ（アルギニン）（ＰＲ）、ポリ（リシン）（ＰＫ）、ポリ（ヒスチジン）（ＰＨ）、ポリ（オルニチン）及びポリ（シトルリン）、ポリ（D-アルギニン）（ＰＤＲ）、ポリ（D-リシン）（ＰＤＫ）、ポリ（D-ヒスチジン）（ＰＤＨ）、ポリ（D-オルニチン）及びポリ（D-シトルリン）、ポリ（L-アルギニン）（ＰＬＲ）、ポリ（L-リシン）（ＰＬＫ）、ポリ（L-ヒスチジン）（ＰＬＨ）、ポリ（L-オルニチン）及びポリ（L-シトルリン））は、１つ以上（例．２つ以上、３つ以上又は４つ以上）のＮＬＳを含む（及び／又はこれとコンジュゲートする）。一部の場合、カチオン性アミノ酸ポリマーはＮ及び／又はＣ末端にＮＬＳを含む。一部の場合、カチオン性アミノ酸ポリマーは内部ＮＬＳを含む。
【００８２】
ナノ粒子のカチオン性ポリペプチド組成物
一部の態様では、ナノ粒子のカチオン性ポリペプチド組成物は、安定性、細胞内コンパートメント化、及び／又はペイロードの放出を媒介しうる。１つの例として述べると、本

発明のナノ粒子のコア内の一般にヒストンテールペプチドと呼ばれるヒストンタンパク質のＮ末端の断片は、一部の場合には、例えば、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ媒介型アセチル化の場合における多様なヒストン修飾により脱プロトン化されうるだけでなく、また、ナノ粒子のコアの構成要素（例．ペイロード）の効果的な核特異的アンパッキングも媒介しうる。一部の場合、カチオン性ポリペプチド組成物は、ヒストン及び／又はヒストンテールペプチド（例えば、カチオン性ポリペプチドはヒストン及び／又はヒストンテールペプチドでありうる）を含む。一部の場合、カチオン性ポリペプチド組成物はＮＬＳ含有ペプチド（例えば、カチオン性ポリペプチドはＮＬＳ含有ペプチドでありうる）を含む。一部の場合、カチオン性ポリペプチド組成物は、架橋を促進するように、システイン残基により隔てられた１つ以上のＮＬＳ含有ペプチドを含む。一部の場合、カチオン性ポリペプチド組成物は、ミトコンドリア局在化シグナルを含むペプチド（例えば、カチオン性ポリペプチドはミトコンドリア局在化シグナルを含むペプチドでありうる）を含む。

【００８３】

ナノ粒子の脱落層（脱落性コート）

一部の態様では、本発明のナノ粒子は、コアを取り囲む（これを封入する）脱落層（本明細書では、「一過性安定化層」とも称する）を含む。一部の場合、本発明の脱落層は、初期の細胞への取込みの前及び取込み時にペイロードを保護しうる。例えば、脱落層を伴わなければ、ペイロードの大半は細胞への内在化に失われる。細胞内環境に入ると、脱落層は「脱落」し（例えば層はｐＨ（及び／又はグルタチオン）感受性でありうる）、コアの構成要素を露出させる。

【００８４】

一部の場合、本発明の脱落層はシリカを含む。一部の場合、本発明のナノ粒子が（例えばシリカによる）脱落層を含む場合、細胞への取込みの確率の低下にもかかわらず、大きな細胞送達効率が観察されうる。特定の理論に束縛されることを望まずに述べると、ナノ粒子のコアの脱落層によるコーティング（例．シリカコーティング）は、コアをシーリングすることが可能であり、（例えば意図された細胞内コンパートメント内のプロセシング時における）ペイロードの放出をもたらす層の脱落までコアを安定化させる。受容体媒介型エンドサイトーシスを介する細胞への侵入の後、ナノ粒子はその最も外側の層を脱落させ、脱落層はエンドソームの酸性化環境又は細胞質ゾルの還元性環境において分解し、一部の場合、局在化シグナル、例えば、核局在化シグナル（ＮＬＳ）及び／又はミトコンドリア局在化シグナルを顕示するコアを露出させる。さらに、脱落層により封入されたナノ粒子のコアは、血清中で安定であることが可能で、in vivoでの投与に適しうる。

【００８５】

任意の所望の脱落層が使用される場合があり、当業者は標的細胞内のどこで（例えばどのような条件下で、例えば低ｐＨ下で）（例えば、エンドソーム、細胞質ゾル、核、リソソームなど）ペイロードが放出されることを所望するのかについて考慮することができる。いつ、どこで、及び／又はどのような条件下で脱落性コートが脱落する（かつ、これによりペイロードを放出する）ことが所望であるのかに応じて、異なる脱落層がより所望されうる。例えば脱落層は酸不安定性でありうる。一部の場合、脱落層はアニオン性脱落層（アニオン性コート）である。一部の場合、脱落層は、シリカ、ペプトイド、ポリシステイン及び／又はセラミック（例．バイオセラミック）を含む。一部の場合、脱落剤は、カルシウム、マンガン、マグネシウム、鉄（例えば脱落層は磁性層（例．Fe_3MnO_2）でありうる）及びリチウムのうちの１つ又は複数を含む。これらの各々は、リン酸塩を含む場合もあり、硫酸塩を含む場合もある。このように一部の場合、脱落剤は、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、リン酸マンガン、硫酸マンガン、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、リン酸鉄、硫酸鉄、リン酸リチウム及び硫酸リチウムのうちの１つ又は複数を含み；これらの各々は、どのようにして及び／又はどのような条件下で脱落層が「脱落する」のかに対して、特定の効果を及ぼしうる。したがって一部の場合、脱落層は、シリカ、ペプトイド、ポリシステイン、セラミック（例．バイオセラミック）、カルシウム、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、酸化カルシウム、ヒドロキシアパタイト、マンガン

、リン酸マンガン、硫酸マンガン、酸化マンガン、マグネシウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、酸化マグネシウム、鉄、リン酸鉄、硫酸鉄、酸化鉄、リチウム、リン酸リチウム及び硫酸リチウム（これらの任意の組合せにおける）のうちの１つ又は複数を含む（例えば、脱落層は、シリカ、ペプトイド、ポリシステイン、セラミック（例．バイオセラミック）、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、リン酸マンガン、硫酸マンガン、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、リン酸鉄、硫酸鉄、リン酸リチウム、硫酸リチウム又はこれらの組合せによるコーティングでありうる）。一部の場合、脱落層はシリカを含む（例えば脱落層はシリカコートでありうる）。一部の場合、脱落層はアルギン酸ゲルを含む。

【００８６】

一部の場合、異なるペイロードに対する異なる放出時間が所望される。例えば一部の場合、ペイロードを早く（例えば標的細胞に接触してから０．５～７日以内に）放出することが所望され、一部の場合、ペイロードを遅く（例えば標的細胞に接触してから６～３０日以内に）放出することが所望される。例えば一部の場合、標的細胞に接触してから０．５～７日以内に（例えば、標的細胞に接触してから０．５～５日、０．５～３日、１～７日、１～５日又は１～３日以内に）、ペイロード（例えば遺伝子編集ツール、例えば、ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ、前記ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ分子、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ＲＮＡ誘導型ポリペプチド及び／又は前記ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ＲＮＡ誘導型ポリペプチドをコードする核酸分子）を放出することが所望されてもよい。一部の場合、標的細胞に接触してから６～４０日以内に（例えば、標的細胞に接触してから６～３０、６～２０、６～１５、７～４０、７～３０、７～２０、７～１５、９～４０、９～３０、９～２０又は９～１５日以内に）、ペイロード（例．ドナーＤＮＡ分子）を放出することが所望されてもよい。一部の場合、放出時間は異なるペイロードを有するナノ粒子を、異なる時点において送達することにより制御されうる。一部の場合、放出時間は、ナノ粒子を同じ時点において送達することにより（異なる製剤の一部として、又は同じ製剤の一部として）制御されうるが、この場合、ナノ粒子の構成要素は、所望の放出時間を達成するようにデザインされる。例えば、速く又は遅く分解する脱落層、分解に対する抵抗性が大きい又は小さいコア構成要素、脱凝縮を受けやすい又は受けやすくないコア構成要素などを使用してもよい（かつ、構成要素のうちのいずれか又は全ては、所望のタイミングを達成するように任意の好都合な組合せで選択されうる）。

【００８７】

一部の場合、ペイロード（例．ドナーＤＮＡ分子）の放出を、別のペイロード（例．１つ以上の遺伝子編集ツール）と比べて遅らせることが所望される。例として述べると、一部の場合、ペイロードとしてドナーＤＮＡ分子を含む第１のナノ粒子は、標的細胞に接触してから６～４０日以内に（例えば、標的細胞に接触してから６～３０、６～２０、６～１５、７～４０、７～３０、７～２０、７～１５、９～４０、９～３０、９～２０又は９～１５日以内に）放出されるようにデザインされ、一方、ペイロードとして１つ以上の遺伝子編集ツール（例．ＺＦＰ又はＺＦＰをコードする核酸、ＴＡＬＥ又はＴＡＬＥをコードする核酸、ＺＦＮ又はＺＦＮをコードする核酸、ＴＡＬＥＮ又はＴＡＬＥＮをコードする核酸、ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ又はＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ分子、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ＲＮＡ誘導型ポリペプチド又はＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ＲＮＡ誘導型ポリペプチドをコードする核酸分子など）を含む第２のナノ粒子は、標的細胞に接触してから０．５～７日以内に（例えば、標的細胞に接触してから０．５～５日、０．５～３日、１～７日、１～５日又は１～３日以内に）放出されるようにデザインされる。第２のナノ粒子は、第１のナノ粒子と同じ製剤の一部の場合もあり、異なる製剤の一部の場合もある。

【００８８】

一部の場合、ナノ粒子は、１つを超えるペイロードを含み、この場合、ペイロードは異なる時点において放出されることが所望される。これはさまざまな異なる方式で達成されうる。例えば、ナノ粒子は１つを超えるコアを有する場合があり、この場合、１つのコア

はペイロード（例．ｓｉＲＮＡ、ｍＲＮＡ及び／又はゲノム編集ツール（例．ＺＦＰ又はＺＦＰをコードする核酸、ＴＡＬＥ又はＴＡＬＥをコードする核酸、ＺＦＮ又はＺＦＮをコードする核酸、ＴＡＬＥＮ又はＴＡＬＥＮをコードする核酸、ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ又はＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ分子、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ＲＮＡ誘導型ポリペプチド又はＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ＲＮＡ誘導型ポリペプチドをコードする核酸分子など））を早く（例えば標的細胞に接触してから０．５～７日以内に、例えば、標的細胞に接触してから０．５～５日、０．５～３日、１～７日、１～５日又は１～３日以内に）放出しうる構成要素を用いて作られ、他のコアはペイロード（例．ドナーＤＮＡ分子）を遅く（例えば標的細胞に接触してから６～４０日以内に、例えば、標的細胞に接触してから６～３０、６～２０、６～１５、７～４０、７～３０、７～２０、７～１５、９～４０、９～３０、９～２０又は９～１５日以内に）放出しうる構成要素を用いて作られる。

【００８９】

別の例として述べると、ナノ粒子は１つを超える脱落層を含むことが可能であり、この場合、外側の脱落層は内側の脱落層が脱落する（別のペイロードを放出する）前に脱落する（ペイロードを放出する）。一部の場合、内側のペイロードはドナーＤＮＡ分子であり、外側のペイロードは１つ以上の遺伝子編集ツール（例．ＺＦＮ又はＺＦＮをコードする核酸、ＴＡＬＥＮ又はＴＡＬＥＮをコードする核酸、ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ又はＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ分子、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ＲＮＡ誘導型ポリペプチド又はＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ＲＮＡ誘導型ポリペプチドをコードする核酸分子など）である。内側及び外側のペイロードは、任意の所望のペイロードで有ることが可能で、これらの一方又は両方は、例えば１つ以上のｓｉＲＮＡ及び／又は１つ以上のｍＲＮＡを含みうる。このように一部の場合、ナノ粒子は、１つを超える脱落層を有することが可能であり、１つのペイロード（例．ｓｉＲＮＡ、ｍＲＮＡ、ゲノム編集ツール（例．ＺＦＰ又はＺＦＰをコードする核酸、ＴＡＬＥ又はＴＡＬＥをコードする核酸、ＺＦＮ又はＺＦＮをコードする核酸、ＴＡＬＥＮ又はＴＡＬＥＮをコードする核酸、ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ又はＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡ分子、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ＲＮＡ誘導型ポリペプチド又はＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ＲＮＡ誘導型ポリペプチドをコードする核酸分子など））を早く（例えば標的細胞に接触してから０．５～７日以内に、例えば、標的細胞に接触してから０．５～５日、０．５～３日、１～７日、１～５日又は１～３日以内に）放出し、別のペイロード（例．ｓｉＲＮＡ、ｍＲＮＡ、ドナーＤＮＡ分子）を遅く（例えば標的細胞に接触してから６～４０日以内に、例えば、標的細胞に接触してから６～３０、６～２０、６～１５、７～４０、７～３０、７～２０、７～１５、９～４０、９～３０、９～２０又は９～１５日以内に）放出するようにデザインされうる。

【００９０】

一部の態様（例えば上述した態様）では、変更された遺伝子発現の時点はペイロード放出時点の代用物として使用されうる。代表的な例として述べると、ペイロードが１２日目までに放出されたのかどうかを決定することを所望する場合、１２日目にナノ粒子送達の所望の結果についてアッセイすることができる。例えば、所望の結果がｓｉＲＮＡを送達することにより標的細胞の標的遺伝子の発現を低減することであった場合、ｓｉＲＮＡが放出されたのかどうかを決定するのに、標的遺伝子の発現についてアッセイ／モニタリングしてもよい。別の例として述べると、所望の結果が例えば目的のタンパク質をコードするＤＮＡ又はｍＲＮＡを送達することにより目的のタンパク質を発現させることであった場合、ペイロードが放出されたのかどうかを決定するのに、目的のタンパク質の発現についてアッセイ／モニタリングしてもよい。さらに別の例として述べると、所望の結果が例えばゲノムＤＮＡの切断及び／又はドナーＤＮＡ分子の配列の挿入を介して標的細胞のゲノムを変更することであった場合、ペイロードが放出されたのかどうかを決定するのに、ターゲティングされた座位からの発現及び／又はゲノムの変更の存在についてアッセイ／モニタリングしてもよい。

【００９１】
このように、一部の場合、脱落層はナノ粒子構成要素の段階的放出をもたらす。例えば一部の場合、ナノ粒子は１つを超える（例．２つ、３つ又は４つの）脱落層を有する。例えば、２つの脱落層を伴うナノ粒子では、このようなナノ粒子は最も内側から最も外側へと、例えば、第１のペイロードを伴うコア；第１の脱落層、例えば、第２のペイロードを伴う中間層；及び中間層を取り囲む、第２の脱落層を有しうる（例．図４）。このような立体構成（複数の脱落層）は、さまざまな所望のペイロードの段階的放出を促進する。さらなる代表的な例として述べると、２つの脱落層を伴う（上述した）ナノ粒子は、コア内の１つ以上の所望の遺伝子編集ツール（例．ドナーＤＮＡ分子、ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ、ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡなどのうちの１つ又は複数）、及び中間層内の別の所望の遺伝子編集ツール（例えば、プログラム型遺伝子編集タンパク質（例．ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓタンパク質、ＺＦＰ、ＺＦＮ、ＴＡＬＥ、ＴＡＬＥＮなど）；プログラム型遺伝子編集タンパク質をコードするＤＮＡ又はＲＮＡ；ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ；ＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡをコードするＤＮＡなどのうちの１つ又は複数）（任意の、所望の組合せにおける）を含みうる。

【００９２】
代替的なパッケージング（例．脂質製剤）

一部の態様では、本発明のコア（例えば上述した構成要素及び／又は構成の任意の組合せを含む）は、脂質ベースの送達システム、例えばカチオン性脂質送達システム（例えば、Chesnoy and Huang, Annu Rev Biophys Biomol Struct. 2000, 29:27-47；Hirko et al., Curr Med Chem. 2003 Jul 10(14):1185-93；及びLiu et al., Curr Med Chem. 2003 Jul 10(14):1307-15参照）の一部である。一部の場合、本発明のコア（例えば上述した構成要素及び／又は構成の任意の組合せを含む）は、脂落層に取り囲まれていない。上述したように、コアはアニオン性ポリマー組成物（例．ポリ（グルタミン酸））、カチオン性ポリマー組成物（例．ポリ（アルギニン））、カチオン性ポリペプチド組成物（例．ヒストンテールペプチド）及びペイロード（例．核酸及び／又はタンパク質のペイロード）を含みうる。

【００９３】
コアが脂質ベースの送達システムの一部である場合には、徐放及び／又はポジショナルリリース（例．環境特異的放出）を伴うコアがデザインされた。例えば一部の場合、コアは、ＥＳＰ、ＥＮＰ及び／又はＥＰＰを含み、このような場合に、これらの構成要素は、所望の条件（例えば細胞内の場所、細胞内の状態、例えばｐＨ、特定の酵素の存在など）に（例えば上述した）コアが遭遇するまで、ペイロードの放出が遅らせられるような比で存在することがある。このような態様の一部では、コアは、アニオン性アミノ酸のD-異性体のポリマー及びアニオン性アミノ酸のL-異性体のポリマーを含み、一部の場合、D-異性体及びL-異性体のポリマーは、（例えば上述した）特定の範囲の比で存在する。一部の場合、コアは、カチオン性アミノ酸のD-異性体のポリマー及びカチオン性アミノ酸のL-異性体のポリマーを含み、一部の場合、D-異性体及びL-異性体のポリマーは、（例えば上述した）特定の範囲の比で存在する。一部の場合、コアは、アニオン性アミノ酸のD-異性体のポリマー及びカチオン性アミノ酸のL-異性体のポリマーを含み、一部の場合、D-異性体及びL-異性体のポリマーは、（例えば上述した）特定の範囲の比で存在する。一部の場合、コアは、アニオン性アミノ酸のL-異性体のポリマー及びカチオン性アミノ酸のD-異性体のポリマーを含み、一部の場合、D-異性体及びL-異性体のポリマーは、（例えば本明細書の別の箇所で説明する）特定の範囲の比で存在する。一部の場合、コアは（例えば本明細書の別の箇所で説明する）ＮＬＳを含むタンパク質を含む。一部の場合、コアは（例えば本明細書の別の箇所で説明する）ＨＴＰを含む。

【００９４】
カチオン性脂質は、遺伝子送達に使用されうる非ウイルス性ベクターで、プラスミドＤＮＡを凝縮する能力を有する。リポフェクションのためのN-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチル塩化アンモニウムの合成の後、ヘッド基、リンカー及び疎水

性ドメインの修飾を含むカチオン性脂質の分子構造の改良が、活発な領域となっている。修飾は、表面電荷密度の増強及び毒性を制限しうる、ステロールベースの疎水性基、例えば、3B-[N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロールの使用を介して、ＤＮＡへの結合及び送達を改善しうる多価ポリアミンの使用を含んだ。ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）のようなヘルパー脂質は、リポソームの疎水性の増強及び六方晶逆相転移を介してトランス遺伝子の発現を改善し、エンドソーム逃避を促進するのに使用されうる。一部の場合、脂質製剤は、ＤＬｉｎ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ、９８Ｎ１２－５、Ｃ１２－２００、コレステロール、ＰＥＧ－脂質、リピドポリアミン；デキサメタゾン－スペルミン（ＤＳ）；及び（例えば、デキサメタゾンとポリアミンスペルミンのコンジュゲーションで得られる）二置換スペルミン（D_2S）のうちの１つ又は複数を含む。ＤＬｉｎ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ、ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ、９８Ｎ１２－５、Ｃ１２－２００及びＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡは、当技術分野で概括された方法により合成されうる（例えば、Heyes et. al, J. Control Release, 2005, 107, 276-287；Semple et. al, Nature Biotechnology, 2010, 28, 172-176；Akinc et. al, Nature Biotechnology, 2008, 26, 561-569；Love et. al, PNAS, 2010, 107, 1864-1869；国際公開第2010/054401号参照；これらの全ては、参照によりそれらの全体において、本明細書に組み込まれる）。

【００９５】

さまざまな脂質ベースの送達システムの例は、以下の刊行物：国際公開第2016/081029号；米国特許出願公開番号、20160263047及び20160237455；並びに、米国特許番号、9,533,047；9,504,747；9,504,651；9,486,538；9,393,200；9,326,940；9,315,828及び9,308,267に記載された送達システムを含むが、これらに限定されず；これらの全ては、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【００９６】

このように、一部の場合、本発明のコアは、脂質（例. カチオン性脂質（例. ＬＩＰＯＦＥＣＴＡＭＩＮＥトランスフェクション試薬））により取り囲まれている。一部の場合、本発明のコアは脂質製剤（例. 脂質ナノ粒子製剤）中に存在する。脂質製剤はリポソーム及び／又はリポプレックスを含みうる。脂質製剤は、Spontaneous Vesicle Formation by Ethanol Dilution（ＳＮＡＬＰ）リポソーム（例えば、カチオン性脂質をポリエチレングリコール（ＰＥＧ）及び／又はプロタミンでコーティングされうる、中性ヘルパー脂質と併せて含む脂質製剤）を含みうる。

【００９７】

脂質製剤はリピドイドベースの製剤でありうる。リピドイドの合成については広範に記載されており、これらの化合物を含有する製剤は本発明の脂質製剤中に含まれる（例えば、Mahon et al., Bioconjug Chem. 2010 21:1448-1454；Schroeder et al., J Intern Med. 2010 267:9-21；Akinc et al., Nat Biotechnol. 2008 26:561-569；Love et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2010 107:1864-1869及びSiegwart et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2011 108:12996-3001参照；これらの全ては、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）。一部の場合、本発明の脂質製剤は、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）；1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）；N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]N,N,N-トリメチル塩化アンモニウム（ＤＯＴＭＡ）；1,2-ジオレオイルオキシ-3-トリメチルアンモニウム-プロパン（ＤＯＴＡＰ）；ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン（ＤＯＧＳ）；N-(3-アミノプロピル)-N,N-ジメチル-2,3-ビス(ドデシルオキシ)-1（ＧＡＰ－ＤＬＲＩＥ）；プロパンアミニウムブロミド；セチルトリメチルアンモニウムブロミド（ＣＴＡＢ）；6-ラウロキシヘキシルオルニチネート（ＬＨＯＮ）；1-(2,3-ジオレオイルオキシプロピル)-2,4,6-トリメチルピリジニウム（２Ｏｃ）；2,3-ジオレイルオキシ-N-[2(スペルミンカルボキサミド-エチル]-N,N-ジメチル-1（ＤＯＳＰＡ）；プロパンアミニウムトリフルオロアセテート；1,2-ジオレイル-3-トリメチルアンモニウム-プロパン（ＤＯＰＡ）；

N-(2-ヒドロキシエチル)-N,N-ジメチル-2,3-ビス(テトラデシルオキシ)-1（ＭＤＲＩＥ）；プロパンアミニウムブロミド；ジミリストキシプロピルジメチルヒドロキシエチルアンモニウムブロミド（ＤＭＲＩ）；3β-[N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)-カルバモイル]コレステロールであるＤＣ－Ｃｈｏｌ；ビス-グアニジウム-tren-コレステロール（ＢＧＴＣ）；1,3-ジオデオキシ-2-(6-カルボキシ-スペルミル)-プロピルアミド（ＤＯＳＰＥＲ）；ジメチルオクタデシルアンモニウムブロミド（ＤＤＡＢ）；ジオクタデシルアミドグリシルスペルミジン（ＤＳＬ）；rac-[(2,3-ジオクタデシルオキシプロピル)(2-ヒドロキシエチル)]-ジメチルアンモニウム（ＣＬＩＰ－１）；クロリドrac-[2(2,3-ジヘキサデシルオキシプロピルオキシメチルオキシ)エチル]トリメチルアンモニウムブロミド（ＣＬＩＰ－６）；エチルジミリストイルホスファチジルコリン（ＥＤＭＰＣ）；1,2-ジステアリルオキシ-N,N-ジメチル-3-アミノプロパン（ＤＳＤＭＡ）；1,2-ジミリストイル-トリメチルアンモニウムプロパン（ＤＭＴＡＰ）；0,0'-ジミリスチル-N-リシルアスパラギン酸（ＤＭＫＥ）；1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-エチルホスホコリン（ＤＳＥＰＣ）；N-パルミトイルD-エリスロ-スフィンゴシルカルバモイル-スペルミン（ＣＣＳ）；N-t-ブチル-N0-テトラデシル-3-テトラデシルアミノプロピオンアミジン；ジC14-アミジン；オクタデセノイルオキシ[エチル-2-ヘプタデセニル-3-ヒドロキシエチル]イミダゾリニウム（ＤＯＴＩＭ）；クロリドN1-コレステリルオキシカルボニル-3,7-ジアザノナン-1,9-ジアミン（ＣＤＡＮ）；2-[3-[ビス(3-アミノプロピル)アミノ]プロピルアミノ]-N-[2-[ジ(テトラデシル)アミノ]-2-オキソエチル]アセトアミド（ＲＰＲ２０９１２０）；ジテトラデシルカルバモイルメチルアセトアミド；1,2-ジリノレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパン（ＤＬｉｎＤＭＡ）；2,2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノエチル-[1,3]-ジオキソラン；ＤＬｉｎ－ＫＣ２－ＤＭＡ；ジリノレイル-メチル-4-ジメチルアミノブチレート；ＤＬｉｎ－ＭＣ３－ＤＭＡ；ＤＬｉｎ－Ｋ－ＤＭＡ；９８Ｎ１２－５；Ｃ１２－２００；コレステロール；ＰＥＧ－脂質；リピドポリアミン；デキサメタゾン－スペルミン（ＤＳ）；及び二置換スペルミン（$Ｄ_{2}$Ｓ）のうちの１つ又は（任意の所望の組合せにおける）複数を含みうる。

【００９８】

ナノ粒子の表面コート（外殻）

一部の場合、脱落層（コート）は、それ自体も、本明細書で「外殻」、「外側のコート」又は「表面コート」と呼ぶさらなる層でコーティングされる。表面コートは複数の異なる機能を果たしうる。例えば、表面コートは送達効率を増大させる場合もあり、及び／又は、本発明のナノ粒子を特定の細胞にターゲティングする場合もある。表面コートは、ペプチド、ポリマー又はリガンド－ポリマーコンジュゲートを含みうる。表面コートはターゲティングリガンドを含みうる。例えば（リンカードメインを伴う又は伴わない）１つ以上のターゲティングリガンドの水溶液をコーティングされたナノ粒子懸濁液（脱落層でコーティングされたナノ粒子の懸濁液）に添加する。例えば一部の場合、プロトン化アンカー残基（アンカードメインの）の最終濃度は２５～３００μＭの間である。一部の場合、表面コートを付加する工程は、平均値粒子サイズを５０～１５０ｎｍの間とし、ゼータ電位を０～－１０ｍＶの間とする粒子の単分散懸濁液をもたらす。

【００９９】

一部の場合、表面コートは最も外側の脱落層と静電相互作用する。例えば一部の場合、ナノ粒子は２つの脱落層（例えば、最も内側から最も外側へと、例えば第１のペイロードを伴うコア；第１の脱落層、例えば第２のペイロードを伴う中間層；及び中間層を取り囲む第２の脱落層）を有し、外殻（表面コート）は、第２の脱落層と（例えば静電的に）相互作用しうる。一部の場合、ナノ粒子は１つの脱落層（例．アニオン性シリカ層）のみを有し、一部の場合、外殻は脱落層と静電相互作用しうる。

【０１００】

したがって、脱落層（例．最も外側の脱落層）がアニオン性である（例えば一部の場合、脱落層が、シリカコートである）場合、表面コートは、表面コートがカチオン性構成要素を含む場合、脱落層と静電相互作用しうる。例えば一部の場合、表面コートは送達分子

を含み、この場合、ターゲティングリガンドはカチオン性アンカードメインとコンジュゲートする。カチオン性アンカードメインは脱落層と静電相互作用し、送達分子をナノ粒子へとアンカリングする。同様に、脱落層（例．最も外側の脱落層）がカチオン性である場合、表面コートは、表面コートがアニオン性構成要素を含む場合、脱落層と静電相互作用しうる。

【０１０１】

一部の態様では、表面コートは細胞膜透過ペプチド（ＣＰＰ）を含む。一部の場合、カチオン性アミノ酸のポリマーは、脂質二重層、ミセル、細胞膜、細胞小器官膜又は小胞膜の横断を促進するポリペプチド、ポリヌクレオチド、炭水化物又は有機若しくは無機化合物を指すのに使用される用語であるＣＰＰ（また、「タンパク質導入ドメイン」（ＰＴＤ）ともいう）として機能しうる。小型の極性分子～大型の高分子及び／又はナノ粒子の別の分子（例えば、本発明のナノ粒子内に埋め込まれ及び／又はこの脱落層と相互作用する）と接合したＰＴＤは、分子の膜の横断、例えば、細胞外空間から細胞内空間へ又は細胞質ゾルから細胞小器官（例．核）内への横断を促進する。

【０１０２】

ＣＰＰの例は、最小限のウンデカペプチドによるタンパク質導入ドメイン（ＹＧＲＫＫＲＲＱＲＲＲ（配列番号１６０）を含む、ＨＩＶ－１ ＴＡＴの残基４７～５７に対応する）；細胞への直接的な侵入に十分な、多数のアルギニン（例．３、４、５、６、７、８、９、１０又は１０～５０のアルギニン）を含むポリアルギニン配列；ＶＰ２２ドメイン（Zender et al. (2002) Cancer Gene Ther. 9(6):489-96）；ショウジョウバエ（Drosophila）属Antennapediaタンパク質導入ドメイン（Noguchi et al. (2003) Diabetes 52(7):1732-1737）；切断型ヒトカルシトニンペプチド（Trehin et al. (2004) Pharm. Research 21:1248-1256）；ポリリシン（Wender et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:13003-13008）；ＲＲＱＲＲＴＳＫＬＭＫＲ（配列番号１６１）；トランスポルタンである、ＧＷＴＬＮＳＡＧＹＬＬＧＫＩＮＬＫＡＬＡＡＬＡＫＫＩＬ（配列番号１６２）；ＫＡＬＡＷＥＡＫＬＡＫＡＬＡＫＡＬＡＫＨＬＡＫＡＬＡＫＡＬＫＣＥＡ（配列番号１６３）；及びＲＱＩＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫＫ（配列番号１６４）を含むが、これらに限定されない。代表的なＣＰＰは、ＹＧＲＫＫＲＲＱＲＲＲ（配列番号１６０）、ＲＫＫＲＲＱＲＲＲ（配列番号１６５）、３アルギニン残基～５０アルギニン残基のアルギニンホモポリマー、ＲＫＫＲＲＱＲＲ（配列番号１６６）、ＹＡＲＡＡＡＲＱＡＲＡ（配列番号１６７）、ＴＨＲＬＰＲＲＲＲＲＲ（配列番号１６８）及びＧＧＲＲＡＲＲＲＲＲＲ（配列番号１６９）を含むが、これらに限定されない。一部の態様では、ＣＰＰは活性化型ＣＰＰ（ＡＣＰＰ）（Aguilera et al. (2009) Integr Biol (Camb) June; 1(5-6): 371-381）である。ＡＣＰＰは、切断性リンカーを介してマッチするポリアニオン（例．Ｇｌｕ９又は「Ｅ９」）と接続されたポリカチオン性ＣＰＰ（例．Ａｒｇ９又は「Ｒ９」）を含み、これにより、正味の電荷をゼロ近くまで低減し、これにより、細胞への接着及び取込みを阻害する。リンカーが切断されるとポリアニオンが放出され、ポリアルギニン及びその固有の接着性の遮蔽を局所的に解除し、これにより、ＡＣＰＰ「を活性化させ」て膜を横断させる。

【０１０３】

一部の場合、ＣＰＰは、コーティングされたコア（脱落層により取り囲まれたコア）を、ＣＰＰを含む組成物（例．溶液）と接触させることにより、ナノ粒子へと付加されうる。次いで、ＣＰＰは脱落層と（例えば静電的に）相互作用しうる。

【０１０４】

一部の場合、表面コートは、カチオン性アミノ酸のポリマー（例．ポリ（アルギニン）、ポリ（L-アルギニン）及び／又はポリ（D-アルギニン）、ポリ（リシン）、ポリ（L-リシン）及び／又はポリ（D-リシン）、ポリ（ヒスチジン）、ポリ（L-ヒスチジン）及び／又はポリ（D-ヒスチジン）、ポリ（オルニチン）、ポリ（L-オルニチン）及び／又はポリ（D-オルニチン）、ポリ（シトルリン）、ポリ（L-シトルリン）及び／又はポリ（D-シトルリン）など）を含む。このように、一部の場合、表面コートはポリ（アルギニン）（例

．ポリ（L-アルギニン））を含む。
【０１０５】
一部の態様では、表面コートは、ヘプタペプチド、例えばセランク（ＴＫＰＲＰＧＰ：配列番号１４７）（例．N-アセチルセランク）及び／又はセマックス（ＭＥＨＦＰＧＰ：配列番号１４８）（例．N-アセチルセマックス）を含む。このように一部の場合、表面コートはセランク（例．N-アセチルセランク）を含む。一部の場合、表面コートはセマックス（例．N-アセチルセマックス）を含む。
【０１０６】
一部の態様では、表面コートは送達分子を含む。送達分子はターゲティングリガンドを含み、一部の場合、ターゲティングリガンドはアンカードメイン（例．カチオン性アンカードメイン又はアニオン性アンカードメイン）にコンジュゲートする。一部の場合、ターゲティングリガンドは、介在リンカーを介してアンカードメイン（例．カチオン性アンカードメイン又はアニオン性アンカードメイン）にコンジュゲートする。
【０１０７】
多価表面コート
一部の場合、表面コートは、（ｉ）上記に記載されたポリマーのうちの１つ又は複数、（ｉｉ）１つ以上のターゲティングリガンド、１つ以上のＣＰＰ及び１つ以上のヘプタペプチドのうちのいずれか１つ又は複数（任意の、所望の組合せにおける）を含む。例えば一部の場合、表面コートは、１つ以上（例．２つ以上、３つ以上）のターゲティングリガンドを含みうるが、また、上記に記載されたカチオン性ポリマーのうちの１つ又は複数も含みうる。一部の場合、表面コートは、１つ以上（例．２つ以上、３つ以上）のターゲティングリガンドを含みうるが、また、１つ以上のＣＰＰも含みうる。さらに、表面コートは、ステルスの機能性を促進する、すなわち血清タンパク質の吸着及び補体活性を防止する、糖ペプチドの任意の組合せを含みうる。これは、プロパルギル修飾残基を含有するペプチドを、シアル酸、ノイラミニン酸などのアジド含有誘導体へとカップリングさせるアジド－アルキンクリック化学反応を介して達せられうる。
【０１０８】
一部の場合、表面コートは、ＣＤ３４及びヘパリン硫酸プロテオグリカンに対する結合を提供するターゲティングリガンドの組合せを含む。例えばポリ（L-アルギニン）は、ヘパリン硫酸プロテオグリカンに対する結合を提供するように表面コートの一部として使用されうる。このように、一部の場合、ナノ粒子をカチオン性ポリマー（例．ポリ（L-アルギニン））で表面コーティングした後で、コーティングされたナノ粒子をヒアルロン酸と共にインキュベートし、これにより、両性イオン性で、かつ多価の表面を形成する。
【０１０９】
一部の態様では、表面コートは多価である。多価表面コートは、２つ以上のターゲティングリガンド（例．異なるリガンドを含む２つ以上の送達分子）を含む表面コートである。多量体の（この場合三量体の）表面コート（外殻）の例は、ターゲティングリガンドである、幹細胞因子（ＳＣＦ）（また、ＣＤ１１７としても公知のｃ－Ｋｉｔ受容体をターゲティングする）、ＣＤ７０（ＣＤ２７をターゲティングする）、及びＳＨ２ドメイン含有タンパク質１Ａ（ＳＨ２Ｄ１Ａ）（ＣＤ１５０をターゲティングする）を含む表面コートである。例えば一部の場合、造血幹細胞（ＨＳＣ）［ＫＬＳ（ｃ－Ｋｉｔ$^{+}$Ｌｉｎ$^{-}$Ｓｃａ－１$^{+}$）及びＣＤ２７$^{+}$／ＩＬ－７Ｒａ$^{-}$／ＣＤ１５０$^{+}$／ＣＤ３４$^{-}$］をターゲティングするために、本発明のナノ粒子は、それぞれ、ｃ－Ｋｉｔ、ＣＤ２７、及びＣＤ１５０をターゲティングするターゲティングリガンドである、ＳＣＦ、ＣＤ７０、及びＳＨ２ドメイン含有タンパク質１Ａ（ＳＨ２Ｄ１Ａ）の組合せ（例えば表１参照）を含む表面コートを含む。一部の場合、このような表面コートは、他のリンパ系及び骨髄系の前駆細胞にもまして、ＨＳＰＣ及び長期ＨＳＣ（ｃ－Ｋｉｔ＋／Ｌｉｎ－／Ｓｃａ－１＋／ＣＤ２７＋／ＩＬ－７Ｒａ－／ＣＤ１５０＋／ＣＤ３４－）を選択的ターゲティングしうる。
【０１１０】
一部の代表的な態様では、３つのターゲティングリガンド全て（ＳＣＦ、ＣＤ７０、及

びＳＨ２Ｄ１Ａ）は、カチオン性アンカードメイン（例えばポリヒスチジン（例．６Ｈ）、ポリアルギニン（例．９Ｒ）など）への融合を介して、ナノ粒子へとアンカリングされる。例えば、（１）ターゲティングポリペプチドであるＳＣＦ（ｃ－Ｋｉｔ受容体をターゲティングする）は、

【０１１１】

【化１】

X*M*EGICRNRVTNNVKDVTKLVANLPKDYMITLKYVPGMDVLPSHCWISEMVVQLSDSLTD
LLDKFSNISEGLSNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENSSKDLKKSFKSPEPRLFTPEEFFRIFNR
SIDAFKDFVVASETSDCVVSSTLSPEKDSRVSVTKPFMLPPVA**X**　（配列番号１９４）

【０１１２】

［配列中、Ｘは、例えば一部の場合、Ｎ及び／又はＣ末端に存在する場合もあり、ポリペプチド配列内に包埋される場合もあるカチオン性アンカードメイン（例えばポリヒスチジン（例．６Ｈ）、ポリアルギニン（例．９Ｒ）など）である］を含むことが可能であり；（２）ターゲティングポリペプチドであるＣＤ７０（ＣＤ２７をターゲティングする）は、

【０１１３】

【化２】

XPEEGSGCSVRRRPYGCVLRAALVPLVAGLVICLVVCIQRFAQAQQQLPLESLGWDVAEL
QLNHTGPQQDPRLYWQGGPALGRSFLHGPELDKGQLRIHRDGIYMVHIQVTLAICSSTTA
SRHHPTTLAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDTLCTNLTGTLLPSRNTD
ETFFGVQWVRP**X**　（配列番号１９５）

【０１１４】

［配列中、Ｘは、例えば一部の場合、Ｎ及び／又はＣ末端に存在する場合もあり、ポリペプチド配列内に包埋される場合もあるカチオン性アンカードメイン（例えばポリヒスチジン（例．６Ｈ）、ポリアルギニン（例．９Ｒ）など）である］を含むことが可能であり；（３）ターゲティングポリペプチドであるＳＨ２Ｄ１Ａ（ＣＤ１５０をターゲティングする）は、

【０１１５】

【化３】

X*SSGLVPRGSH*MDAVAVYHGKISRETGEKLLLATGLDGSYLLRDSESVPGVYCLCVLYHG
YIYTYRVSQTETGSWSAETAPGVHKRYFRKIKNLISAFQKPDQGIVIPLQYPVEKKSS*ARS*
TQGTTGIREDPDVCLKAP　（配列番号１９６）

【０１１６】

［配列中、Ｘは、例えば一部の場合、Ｎ及び／又はＣ末端に存在する場合もあり、ポリペプチド配列内に包埋される場合もあるカチオン性アンカードメイン（例えばポリヒスチジン（例．６Ｈ）、ポリアルギニン（例．９Ｒ）など）である］（例えば、

【０１１７】

【化４】

*MGSS***X***SSGLVPRGSH*MDAVAVYHGKISRETGEKLLLATGLDGSYLLRDSESVPGVYCLC
VLYHGYIYTYRVSQTETGSWSAETAPGVHKRYFRKIKNLISAFQKPDQGIVIPLQYPVEKK
SSARSTQGTTGIREDPDVCLKAP　（配列番号１９７）

【０１１８】

）を含みうる。

【０１１９】

上述したように、本発明のナノ粒子は、所望の細胞をターゲティングするために、又は所望の細胞の組合せをターゲティングするために、複数のターゲティングリガンド（表面

コートの一部としての）を含みうる。マウス及びヒトの造血細胞系統内の目的の細胞の例は、これらの細胞について同定されているマーカーと共に、図８のパネルＡ及びＢに示される。例えば、目的の細胞表面マーカーの多様な組合せは、［マウス］（ｉ）ＣＤ１５０；（ｉｉ）Ｓｃａ１、ｃＫｉｔ、ＣＤ１５０；（ｉｉｉ）ＣＤ１５０及びＣＤ４９ｂ；（ｉｖ）Ｓｃａ１、ｃＫｉｔ、ＣＤ１５０及びＣＤ４９ｂ；（ｖ）ＣＤ１５０及びＦｌｔ３；（ｖｉ）Ｓｃａ１、ｃＫｉｔ、ＣＤ１５０及びＦｌｔ３；（ｖｉｉ）Ｆｌｔ３及びＣＤ３４；（ｖｉｉｉ）Ｆｌｔ３、ＣＤ３４、Ｓｃａ１及びｃＫｉｔ；（ｉｘ）Ｆｌｔ３及びＣＤ１２７；（ｘ）Ｓｃａ１、ｃＫｉｔ、Ｆｌｔ３及びＣＤ１２７；（ｘｉ）ＣＤ３４；（ｘｉｉ）ｃＫｉｔ及びＣＤ３４；（ｘｉｉｉ）ＣＤ１６／３２及びＣＤ３４；（ｘｉｖ）ｃＫｉｔ、ＣＤ１６／３２及びＣＤ３４；（ｘｖ）ｃＫｉｔ；並びに［ヒト］（ｉ）ＣＤ９０及びＣＤ４９ｆ；（ｉｉ）ＣＤ３４、ＣＤ９０及びＣＤ４９ｆ；（ｉｉｉ）ＣＤ３４；（ｉｖ）ＣＤ４５ＲＡ及びＣＤ１０；（ｖ）ＣＤ３４、ＣＤ４５ＲＡ及びＣＤ１０；（ｖｉ）ＣＤ４５ＲＡ及びＣＤ１３５；（ｖｉｉ）ＣＤ３４、ＣＤ３８、ＣＤ４５ＲＡ及びＣＤ１３５；（ｖｉｉｉ）ＣＤ１３５；（ｉｘ）ＣＤ３４、ＣＤ３８及びＣＤ１３５；（ｘ）ＣＤ３４及びＣＤ３８を含むが、これらに限定されない。したがって一部の場合、表面コートは、［マウス］（ｉ）ＣＤ１５０；（ｉｉ）Ｓｃａ１、ｃＫｉｔ、ＣＤ１５０；（ｉｉｉ）ＣＤ１５０及びＣＤ４９ｂ；（ｉｖ）Ｓｃａ１、ｃＫｉｔ、ＣＤ１５０及びＣＤ４９ｂ；（ｖ）ＣＤ１５０及びＦｌｔ３；（ｖｉ）Ｓｃａ１、ｃＫｉｔ、ＣＤ１５０及びＦｌｔ３；（ｖｉｉ）Ｆｌｔ３及びＣＤ３４；（ｖｉｉｉ）Ｆｌｔ３、ＣＤ３４、Ｓｃａ１及びｃＫｉｔ；（ｉｘ）Ｆｌｔ３及びＣＤ１２７；（ｘ）Ｓｃａ１、ｃＫｉｔ、Ｆｌｔ３及びＣＤ１２７；（ｘｉ）ＣＤ３４；（ｘｉｉ）ｃＫｉｔ及びＣＤ３４；（ｘｉｉｉ）ＣＤ１６／３２及びＣＤ３４；（ｘｉｖ）ｃＫｉｔ、ＣＤ１６／３２及びＣＤ３４；（ｘｖ）ｃＫｉｔ；並びに［ヒト］（ｉ）ＣＤ９０及びＣＤ４９ｆ；（ｉｉ）ＣＤ３４、ＣＤ９０及びＣＤ４９ｆ；（ｉｉｉ）ＣＤ３４；（ｉｖ）ＣＤ４５ＲＡ及びＣＤ１０；（ｖ）ＣＤ３４、ＣＤ４５ＲＡ及びＣＤ１０；（ｖｉ）ＣＤ４５ＲＡ及びＣＤ１３５；（ｖｉｉ）ＣＤ３４、ＣＤ３８、ＣＤ４５ＲＡ及びＣＤ１３５；（ｖｉｉｉ）ＣＤ１３５；（ｉｘ）ＣＤ３４、ＣＤ３８及びＣＤ１３５；（ｘ）ＣＤ３４及びＣＤ３８から選択される表面タンパク質又は表面タンパク質の組合せに対する結合を提供する、１つ以上のターゲティングリガンドを含む。本発明のナノ粒子は、１つを超えるターゲティングリガンドを含むことが可能であり、一部の細胞は、マーカーの重複を含むため、複数の異なる細胞は、表面コートの組合せを使用してターゲティングされる場合があり、例えばある場合には、表面コートは１つの特定の細胞をターゲティングしうるが、他の場合には、表面コートは１つを超える特定の細胞（例．２以上、３以上、４以上の細胞）をターゲティングしうる。例えば、造血系統内の細胞の任意の組合せがターゲティングされうる。代表的な例として述べると、ＣＤ３４へのターゲティング（ＣＤ３４に対する結合を提供するターゲティングリガンドを使用する）は、ナノ粒子によるペイロードの造血系統内のいくつかの異なる細胞への送達をもたらしうる（例えば図８パネルＡ及びＢ）。

【０１２０】

送達分子

（ｉ）タンパク質若しくは核酸のペイロード、又は（ｉｉ）帯電ポリマーであるポリペプチドドメインへとコンジュゲートされたターゲティングリガンド（ペプチド）を含む送達分子が提供される。ターゲティングリガンドは、（ｉ）細胞表面タンパク質との結合、そして場合によっては、（ｉｉ）長期エンドソームリサイクリング経路への関与を提供する。一部の場合、ターゲティングリガンドが帯電ポリマーであるポリペプチドドメインとコンジュゲートすると、帯電ポリマーであるポリペプチドドメインは核酸ペイロード及び／又はタンパク質ペイロードと相互作用する（例えばこれと共に凝縮される）。一部の場合、ターゲティングリガンドは介在リンカーを介してコンジュゲートする。異なる可能なコンジュゲーション戦略（すなわち、送達分子の構成要素の異なる可能な配置）の例については、図６を参照。一部の場合、ターゲティングリガンドは細胞表面タンパク質に対する結合を提供するが、長期エンドソームリサイクリング経路への関与は、必ずしももたら

さない。したがって、また、タンパク質若しくは核酸のペイロードとコンジュゲートするか、又は帯電ポリマーであるポリペプチドドメインとコンジュゲートしたターゲティングリガンド（例．ペプチドであるターゲティングリガンド）であって、細胞表面タンパク質に対する結合を提供する（が、長期エンドソームリサイクリング経路への関与は、必ずしももたらさない）ターゲティングリガンドを含む送達分子も提供される。

【０１２１】

一部の場合、本明細書で開示する送達分子は、核酸又はタンパク質ペイロードがその細胞外標的に到達し（例えば、細胞表面タンパク質に対する結合を提供することにより）、優先的に、リソソーム内で破壊されたり、又は「短期」エンドソームリサイクリング型エンドソームへと隔離されたりすることがないようにデザインされる。代わりに、本発明の送達分子は、エンドソーム逃避及び／又はエンドソームの細胞小器官との融合を可能としうる「長期」（間接的／緩徐）エンドソームリサイクリング経路の関与をもたらしうる。

【０１２２】

例えば一部の場合、β－アレスチンは、７回膜貫通型ＧＰＣＲ（McGovern et al., Handb Exp Pharmacol. 2014;219:341-59；Goodman et al., Nature. 1996 Oct 3;383(6599):447-50；Zhang et al., J Biol Chem. 1997 Oct 24;272(43):27005-14）及び／又は１回膜貫通型受容体チロシンキナーゼ（ＲＴＫ）の、（例えばエンドサイトーシス時における）アクチン細胞骨格からの切断を媒介し、所望のエンドソーム分取経路を誘発することに関与する。したがって一部の態様では、本発明の送達分子のターゲティングリガンドは、細胞表面タンパク質への結合時におけるβ－アレスチンの関与（例えばシグナル伝達にバイアスをもたらし、オーソステリックの結合後におけるエンドサイトーシスを介して細胞内移行を促進する）をもたらす。

【０１２３】

帯電ポリマーであるポリペプチドドメイン

一部の場合、（例えば対象を送達する分子の）ターゲティングリガンドは、帯電ポリマーであるポリペプチドドメイン（アンカードメイン（例．カチオン性アンカードメイン又はアニオン性アンカードメイン））（例えば図５及び図６）とコンジュゲートする。帯電ポリマーであるポリペプチドドメインは、反復残基（例えばカチオン性残基（例．アルギニン、リシン、ヒスチジン））を含みうる。一部の場合、帯電ポリマーであるポリペプチドドメイン（アンカードメイン）は、３～３０アミノ酸（例えば、３～２８、３～２５、３～２４、３～２０、４～３０、４～２８、４～２５、４～２４、又は４～２０アミノ酸；又は例えば、４～１５、４～１２、５～３０、５～２８、５～２５、５～２０、５～１５、５～１２アミノ酸）長である。一部の場合、帯電ポリマーであるポリペプチドドメイン（アンカードメイン）のアミノ酸長は４～２４である。一部の場合、帯電ポリマーであるポリペプチドドメイン（アンカードメイン）のアミノ酸長は５～１０である。帯電ポリマーであるポリペプチドドメインの適切な例は、ＲＲＲＲＲＲＲＲＲ（９Ｒ）（配列番号１５）及びＨＨＨＨＨＨ（６Ｈ）（配列番号１６）を含むが、これらに限定されない。

【０１２４】

帯電ポリマーであるポリペプチドドメイン（カチオン性アンカードメイン、アニオン性アンカードメイン）は、任意の好都合な帯電ドメイン（例．カチオン性帯電ドメイン）でありうる。例えばこのようなドメインは、ヒストンテールペプチド（ＨＴＰ）（本明細書の別の箇所でより詳細に説明する）でありうる。一部の場合、帯電ポリマーであるポリペプチドドメインは、ヒストン及び／又はヒストンテールペプチド（例えばカチオン性ポリペプチドはヒストン及び／又はヒストンテールペプチドでありうる）を含む。一部の場合、帯電ポリマーであるポリペプチドドメインは、ＮＬＳ含有ペプチド（例えばカチオン性ポリペプチドはＮＬＳ含有ペプチドでありうる）を含む。一部の場合、帯電ポリマーであるポリペプチドドメインは、ミトコンドリア局在化シグナルを含むペプチド（例え、カチオン性ポリペプチドはミトコンドリア局在化シグナルを含むペプチドでありうる）を含む。

【０１２５】

一部の場合、対象を送達する分子の帯電ポリマーであるポリペプチドドメインは、送達分子が（例えば凝縮のために）ペイロード（例．核酸ペイロード及び／又はタンパク質ペイロード）と相互作用（例．静電相互作用）するための方法として使用される。

【０１２６】

一部の場合、対象を送達する分子の帯電ポリマーであるポリペプチドドメインは、例えば、ターゲティングリガンドがナノ粒子を所望の細胞／細胞表面タンパク質へとターゲティングする（例えば図５）のに使用されるように、送達分子を伴うナノ粒子のコート表面へのアンカーとして使用される。したがって一部の場合、帯電ポリマーであるポリペプチドドメインは、ナノ粒子の帯電安定化層と静電相互作用する。例えば一部の場合、ナノ粒子は、安定化層（例．シリカ、ペプトイド、ポリシステイン又はリン酸カルシウムコーティング）により取り囲まれた（例えば、核酸、タンパク質及び／又はリボ核タンパク質の複合体であるペイロードを含む）コアを含む。一部の場合、安定化層は負の電荷を有し、したがって、正に帯電したポリマーであるポリペプチドドメインは安定化層と相互作用し、送達分子をナノ粒子へと効果的にアンカリングし、ナノ粒子表面を本発明のターゲティングリガンドでコーティングしうる（例．図５）。一部の場合、安定化層は正の電荷を有し、したがって負に帯電したポリマーであるポリペプチドドメインは安定化層と相互作用し、送達分子をナノ粒子へと効果的にアンカリングし、ナノ粒子表面を本発明のターゲティングリガンドでコーティングしうる。コンジュゲーションは任意の好都合な技法により達せられる場合があり、当業者には多くの異なるコンジュゲーション化学反応が公知であろう。一部の場合、コンジュゲーションは、スルフヒドリル化学反応（例．ジスルフィド結合）を介する。一部の場合、コンジュゲーションはアミン反応性化学反応を使用して達せられる。一部の場合、ターゲティングリガンドと帯電ポリマーであるポリペプチドドメインは、同じポリペプチドの一部であることによりコンジュゲートされる。

【０１２７】

一部の場合、帯電ポリマーであるポリペプチドドメイン（カチオン性）は、ポリ（アルギニン）（ＰＲ）、ポリ（リシン）（ＰＫ）、ポリ（ヒスチジン）（ＰＨ）、ポリ（オルニチン）、ポリ（シトルリン）及びこれらの組合せから選択されるポリマーを含みうる。一部の場合、所与のカチオン性アミノ酸ポリマーは、アルギニン、リシン、ヒスチジン、オルニチン及びシトルリン残基（任意の好都合な組合せにおける）のミックスを含みうる。ポリマーは、L-異性体のポリマーとして存在する場合もあり、D-異性体のポリマーとして存在する場合もあり、ここで、D-異性体は分解に長くかかるため、標的細胞内でより安定である。したがって、D-異性体のポリ（アミノ酸）の組入れは分解（及びその後のペイロードの放出）を遅らせる。したがって、ペイロード放出速度は制御される場合があり、D-異性体のポリマー対L-異性体のポリマーの比に比例し、ここで、D-異性体対L-異性体の比はペイロード放出の持続時間を増大させる（すなわち、放出速度を減少させる）。言い換えれば、D-異性体とL-異性体との相対量は、ナノ粒子のコアの徐放動態並びに分解への酵素感受性及びペイロード放出をモジュレートしうる。

【０１２８】

一部の場合、カチオン性ポリマーは、カチオン性アミノ酸ポリマーのD-異性体及びL-異性体（例．ポリ（アルギニン）（ＰＲ）、ポリ（リシン）（ＰＫ）、ポリ（ヒスチジン）（ＰＨ）、ポリ（オルニチン）、ポリ（シトルリン））を含む。一部の場合、D-異性体対L-異性体の比は、１０：１～１：１０（例．８：１～１：１０、６：１～１：１０、４：１～１：１０、３：１～１：１０、２：１～１：１０、１：１～１：１０、１０：１～１：８、８：１～１：８、６：１～１：８、４：１～１：８、３：１～１：８、２：１～１：８、１：１～１：８、１０：１～１：６、８：１～１：６、６：１～１：６、４：１～１：６、３：１～１：６、２：１～１：６、１：１～１：６、１０：１～１：４、８：１～１：４、６：１～１：４、４：１～１：４、３：１～１：４、２：１～１：４、１：１～１：４、１０：１～１：３、８：１～１：３、６：１～１：３、４：１～１：３、３：１～１：３、２：１～１：３、１：１～１：３、１０：１～１：２、８：１～１：２、６：１～１：２、４：１～１：２、３：１～１：２、２：１～１：２、１：１～１：２、１

０：１～１：１、８：１～１：１、６：１～１：１、４：１～１：１、３：１～１：１又は２：１～１：１）である。

【０１２９】

したがって一部の場合、カチオン性ポリマーは、D-異性体（例．ポリ（D-アルギニン）、ポリ（D-リシン）、ポリ（D-ヒスチジン）、ポリ（D-オルニチン）及びポリ（D-シトルリン）から選択される）のポリマーである第１のカチオン性ポリマー（例．アミノ酸ポリマー）を含み；L-異性体（例．ポリ（L-アルギニン）、ポリ（L-リシン）、ポリ（L-ヒスチジン）、ポリ（L-オルニチン）及びポリ（L-シトルリン）から選択される）のポリマーである第２のカチオン性ポリマー（例．アミノ酸ポリマー）を含む。一部の場合、第１のカチオン性ポリマー（D-異性体）対第２のカチオン性ポリマー（L-異性体）の比は、１０：１～１：１０（例．８：１～１：１０、６：１～１：１０、４：１～１：１０、３：１～１：１０、２：１～１：１０、１：１～１：１０、１０：１～１：８、８：１～１：８、６：１～１：１０、４：１～１：１０、３：１～１：１０、２：１～１：１０、１：１～１：１０、１０：１～１：８、８：１～１：８、６：１～１：８、４：１～１：８、３：１～１：８、２：１～１：８、１：１～１：８、１０：１～１：６、８：１～１：６、６：１～１：６、４：１～１：６、３：１～１：６、２：１～１：６、１：１～１：６、１０：１～１：４、８：１～１：４、６：１～１：４、４：１～１：４、３：１～１：４、２：１～１：４、１：１～１：４、１０：１～１：３、８：１～１：３、６：１～１：３、４：１～１：３、３：１～１：３、２：１～１：３、１：１～１：３、１０：１～１：２、８：１～１：２、６：１～１：２、４：１～１：２、３：１～１：２、２：１～１：２、１：１～１：２、１０：１～１：１、８：１～１：１、６：１～１：１、４：１～１：１、３：１～１：１又は２：１～１：１）である。

【０１３０】

一部の態様では、カチオン性ポリマーは、ポリ（エチレンイミン）、ポリ（アミドアミン）（ＰＡＭＡＭ）、ポリ（アスパルタミド）、ポリペプトイド（例えばコア凝縮のために「スパイダーウェブ」様分枝を形成するための）、電荷官能化ポリエステル、カチオン性多糖、アセチル化されたアミノ糖、キトサン又はこれらの任意の組合せを含むカチオン性ポリマー（例．直鎖形態又は分枝形態）を（例えば、カチオン性ポリマーの前出の例のうちのいずれかに加えて、又はこの代わりに）含む。

【０１３１】

一部の態様では、カチオン性ポリマーは、１～２００ｋＤａ（例．１～１５０、１～１００、１～５０、５～２００、５～１５０、５～１００、５～５０、１０～２００、１０～１５０、１０～１００、１０～５０、１５～２００、１５～１５０、１５～１００又は１５～５０ｋＤａ）の分子量を有しうる。例として述べると、一部の場合、カチオン性ポリマーは例えば分子量約２９ｋＤａのポリ（L-アルギニン）を含む。別の例として述べると、一部の場合、カチオン性ポリマーは分子量約２５ｋＤａ（ＰＥＩ）の直鎖状ポリ（エチレンイミン）を含む。別の例として述べると、一部の場合、カチオン性ポリマーは分子量約１０ｋＤａの分枝状ポリ（エチレンイミン）を含む。別の例として述べると、一部の場合、カチオン性ポリマーは分子量約７０ｋＤａの分枝状ポリ（エチレンイミン）を含む。一部の場合、カチオン性ポリマーはＰＡＭＡＭを含む。

【０１３２】

一部の場合、カチオン性アミノ酸ポリマーは、例えば、リンカー、ＮＬＳ及び／又はカチオン性ポリペプチド（例．ヒストン又はＨＴＰ）とのコンジュゲーションを促進するシステイン残基を含む。例えばシステイン残基は、スルフヒドリル化学反応（例．ジスルフィド結合）及び／又はアミン反応性化学反応を介する架橋（コンジュゲーション）のために使用されうる。したがって一部の態様では、カチオン性ポリマー組成物のカチオン性アミノ酸ポリマー（例．ポリ（アルギニン）（ＰＲ）、ポリ（リシン）（ＰＫ）、ポリ（ヒスチジン）（ＰＨ）、ポリ（オルニチン）及びポリ（シトルリン）、ポリ（D-アルギニン）（ＰＤＲ）、ポリ（D-リシン）（ＰＤＫ）、ポリ（D-ヒスチジン）（ＰＤＨ）、ポリ（D-オルニチン）及びポリ（D-シトルリン）、ポリ（L-アルギニン）（ＰＬＲ）、ポリ（L-

リシン）（ＰＬＫ）、ポリ（L-ヒスチジン）（ＰＬＨ）、ポリ（L-オルニチン）及びポリ（L-シトルリン））は、システイン残基を含む。一部の場合、カチオン性アミノ酸ポリマーは、Ｎ及び／又はＣ末端にシステイン残基を含む。一部の場合、カチオン性アミノ酸ポリマーは内部システイン残基を含む。

【０１３３】

一部の場合、カチオン性アミノ酸ポリマーは核局在化シグナル（ＮＬＳ）（以下により詳細に説明する）を含む（及び／又はこれとコンジュゲートする）。したがって一部の態様では、カチオン性アミノ酸ポリマー（例．ポリ（アルギニン）（ＰＲ）、ポリ（リシン）（ＰＫ）、ポリ（ヒスチジン）（ＰＨ）、ポリ（オルニチン）及びポリ（シトルリン）、ポリ（D-アルギニン）（ＰＤＲ）、ポリ（D-リシン）（ＰＤＫ）、ポリ（D-ヒスチジン）（ＰＤＨ）、ポリ（D-オルニチン）及びポリ（D-シトルリン）、ポリ（L-アルギニン）（ＰＬＲ）、ポリ（L-リシン）（ＰＬＫ）、ポリ（L-ヒスチジン）（ＰＬＨ）、ポリ（L-オルニチン）及びポリ（L-シトルリン））は、１つ以上（例．２つ以上、３つ以上又は４つ以上）のＮＬＳを含む。一部の場合、カチオン性アミノ酸ポリマーはＮ及び／又はＣ末端にＮＬＳを含む。一部の場合、カチオン性アミノ酸ポリマーは内部ＮＬＳを含む。

【０１３４】

一部の場合、帯電ポリマーであるポリペプチドドメインは、核酸ペイロード及び／又はタンパク質ペイロードと共に凝縮される（例えば図６）。一部の場合、帯電ポリマーであるポリペプチドドメインはタンパク質ペイロードと静電相互作用する。一部の場合、帯電ポリマーであるポリペプチドドメインは、シリカ、塩、及び／又はアニオン性ポリマーと共に、共凝縮されて、エンドソーム緩衝能、安定性、及び、例えば任意の徐放を付加される。一部の場合、対象を送達する分子の帯電ポリマーであるポリペプチドドメインは、例えば、約４～２５アミノ酸の長さ又は４～１５アミノ酸の長さの、反復するカチオン性残基（例．アルギニン、リシン及び／又はヒスチジン）の連なりである。このようなドメインは、送達分子がアニオン性脱落性マトリックス（例．共凝縮されたアニオン性ポリマー）と静電相互作用することを可能としうる。したがって一部の場合、本発明の対象を送達する分子の帯電ポリマーであるポリペプチドドメインは、アニオン性脱落性マトリックス、並びに核酸及び／又はタンパク質のペイロードと（例えば静電）相互作用する反復するカチオン性残基の連なりである。したがって一部の場合、対象を送達する分子は、ペイロード（例．核酸及び／又はタンパク質）と相互作用し、アニオン性ポリマーを伴う組成物の一部として存在する（例えば、ペイロード及びアニオン性ポリマーと共に共凝縮される）。

【０１３５】

アニオン性脱落性マトリックスのアニオン性ポリマー（すなわち、対象を送達する分子の帯電ポリマーであるポリペプチドドメインと相互作用するアニオン性ポリマー）は、任意の好都合なアニオン性ポリマー／ポリマー組成物でありうる。例は、ポリ（グルタミン酸）（例．ポリ（D-グルタミン酸）（ＰＤＥ）、ポリ（L-グルタミン酸）（ＰＬＥ）、多様な所望の比におけるＰＤＥ及びＰＬＥなど）を含むが、これらに限定されない。一部の場合、ＰＤＥはアニオン性脱落性マトリックスとして使用される。一部の場合、ＰＬＥはアニオン性脱落性マトリックス（アニオン性ポリマー）として使用される。一部の場合、ＰＤＥはアニオン性脱落性マトリックス（アニオン性ポリマー）として使用される。一部の場合、ＰＤＥ及びＰＬＥは例えば１：１の比（５０％のＰＤＥ、５０％のＰＬＥ）でアニオン性脱落性マトリックス（アニオン性ポリマー）として使用される。

【０１３６】

アニオン性ポリマー

アニオン性ポリマーは１つ以上のアニオン性アミノ酸ポリマーを含みうる。例えば一部の場合、本発明のアニオン性ポリマー組成物は、ポリ（グルタミン酸）（ＰＥＡ）、ポリ（アスパラギン酸）（ＰＤＡ）及びこれらの組合せから選択されるポリマーを含む。一部の場合、所与のアニオン性アミノ酸ポリマーは、アスパラギン酸残基とグルタミン酸残基のミックスを含みうる。各ポリマーは、組成物中でL-異性体のポリマーとして存在する場

合もあり、D-異性体のポリマーとして存在する場合もあり、ここで、D-異性体は分解に長くかかるため、標的細胞内でより安定である。したがって、D-異性体のポリ（アミノ酸）の組入れは分解（及び、その後のペイロードの放出）を遅らせうる。したがって、ペイロード放出速度は制御される場合があり、D-異性体のポリマー対L-異性体のポリマーの比に比例し、ここで、D-異性体対L-異性体の比は、ペイロード放出の持続時間を増大させる（すなわち、放出速度を減少させる）。言い換えれば、D-異性体とL-異性体との相対量は、ナノ粒子のコアの徐放動態、並びに分解への酵素感受性及びペイロード放出をモジュレートしうる。

【０１３７】

一部の場合、アニオン性ポリマー組成物は、アニオン性アミノ酸ポリマーのD-異性体のポリマー及びL-異性体のポリマー（例．ポリ（グルタミン酸）（ＰＥＡ）及びポリ（アスパラギン酸）（ＰＤＡ））を含む。一部の場合、D-異性体対L-異性体の比は、１０：１～１：１０（例．８：１～１：１０、６：１～１：１０、４：１～１：１０、３：１～１：１０、２：１～１：１０、１：１～１：１０、１０：１～１：８、８：１～１：８、６：１～１：８、４：１～１：８、３：１～１：８、２：１～１：８、１：１～１：８、１０：１～１：６、８：１～１：６、６：１～１：６、４：１～１：６、３：１～１：６、２：１～１：６、１：１～１：６、１０：１～１：４、８：１～１：４、６：１～１：４、４：１～１：４、３：１～１：４、２：１～１：４、１：１～１：４、１０：１～１：３、８：１～１：３、６：１～１：３、４：１～１：３、３：１～１：３、２：１～１：３、１：１～１：３、１０：１～１：２、８：１～１：２、６：１～１：２、４：１～１：２、３：１～１：２、２：１～１：２、１：１～１：２、１０：１～１：１、８：１～１：１、６：１～１：１、４：１～１：１、３：１～１：１又は２：１～１：１）である。

【０１３８】

したがって一部の場合、アニオン性ポリマー組成物は、D-異性体（例．ポリ（D-グルタミン酸）（ＰＤＥＡ）及びポリ（D-アスパラギン酸）（ＰＤＤＡ）から選択される）のポリマーである第１のアニオン性ポリマー（例．アミノ酸ポリマー）を含み；L-異性体（例．ポリ（L-グルタミン酸）（ＰＬＥＡ）及びポリ（L-アスパラギン酸）（ＰＬＤＡ）から選択される）のポリマーである第２のアニオン性ポリマー（例．アミノ酸ポリマー）を含む。一部の場合、第１のアニオン性ポリマー（D-異性体）対第２のアニオン性ポリマー（L-異性体）の比は、１０：１～１：１０（例．８：１～１：１０、６：１～１：１０、４：１～１：１０、３：１～１：１０、２：１～１：１０、１：１～１：１０、１０：１～１：８、８：１～１：８、６：１～１：８、４：１～１：８、３：１～１：８、２：１～１：８、１：１～１：８、１０：１～１：６、８：１～１：６、６：１～１：６、４：１～１：６、３：１～１：６、２：１～１：６、１：１～１：６、１０：１～１：４、８：１～１：４、６：１～１：４、４：１～１：４、３：１～１：４、２：１～１：４、１：１～１：４、１０：１～１：３、８：１～１：３、６：１～１：３、４：１～１：３、３：１～１：３、２：１～１：３、１：１～１：３、１０：１～１：２、８：１～１：２、６：１～１：２、４：１～１：２、３：１～１：２、２：１～１：２、１：１～１：２、１０：１～１：１、８：１～１：１、６：１～１：１、４：１～１：１又は２：１～１：１）である。

【０１３９】

一部の態様では、アニオン性ポリマー組成物は、グリコサミノグリカン、糖タンパク質、多糖、ポリ（マヌロン酸）、ポリ（グルクロン酸）、ヘパリン、硫酸ヘパリン、コンドロイチン、硫酸コンドロイチン、ケラタン、硫酸ケラタン、アグレカン、ポリ（グルコサミン）又はこれらの任意の組合せを含むアニオン性ポリマーを含む（例えば、アニオン性ポリマーの前出の例のうちのいずれかに加えて、又はこの代わりに）。

【０１４０】

一部の態様では、アニオン性ポリマーは、１～２００ｋＤａ（例．１～１５０、１～１００、１～５０、５～２００、５～１５０、５～１００、５～５０、１０～２００、１０～１５０、１０～１００、１０～５０、１５～２００、１５～１５０、１５～１００又は

１５～５０ｋＤａ）の分子量を有しうる。例として述べると、一部の場合、アニオン性ポリマーは分子量を約１５ｋＤａとするポリ（グルタミン酸）を含む。

【０１４１】

一部の場合、アニオン性アミノ酸ポリマーは、例えば、リンカー、ＮＬＳ、及び／又はカチオン性ポリペプチド（例．ヒストン又はＨＴＰ）とのコンジュゲーションを促進するシステイン残基を含む。例えばシステイン残基は、スルフヒドリル化学反応（例．ジスルフィド結合）及び／又はアミン反応性化学反応を介する架橋（コンジュゲーション）のために使用されうる。したがって一部の態様では、アニオン性ポリマー組成物のアニオン性アミノ酸ポリマー（例．ポリ（グルタミン酸）（ＰＥＡ）、ポリ（アスパラギン酸）（ＰＤＡ）、ポリ（D-グルタミン酸）（ＰＤＥＡ）、ポリ（D-アスパラギン酸）（ＰＤＤＡ）、ポリ（L-グルタミン酸）（ＰＬＥＡ）、ポリ（L-アスパラギン酸）（ＰＬＤＡ））は、システイン残基を含む。一部の場合、アニオン性アミノ酸ポリマーはＮ及び／又はＣ末端にシステイン残基を含む。一部の場合、アニオン性アミノ酸ポリマーは内部システイン残基を含む。

【０１４２】

一部の場合、アニオン性アミノ酸ポリマーは核局在化シグナル（ＮＬＳ）（以下により詳細に説明する）を含む（及び／又はこれとコンジュゲートする）。したがって一部の態様では、アニオン性ポリマー組成物のアニオン性アミノ酸ポリマー（例．ポリ（グルタミン酸）（ＰＥＡ）、ポリ（アスパラギン酸）（ＰＤＡ）、ポリ（D-グルタミン酸）（ＰＤＥＡ）、ポリ（D-アスパラギン酸）（ＰＤＤＡ）、ポリ（L-グルタミン酸）（ＰＬＥＡ）、ポリ（L-アスパラギン酸）（ＰＬＤＡ））は、１つ以上（例．２つ以上、３つ以上又は４つ以上）のＮＬＳを含む（及び／又はこれとコンジュゲートする）。一部の場合、アニオン性アミノ酸ポリマーはＮ及び／又はＣ末端にＮＬＳを含む。一部の場合、アニオン性アミノ酸ポリマーは内部ＮＬＳを含む。

【０１４３】

一部の場合、アニオン性ポリマーはターゲティングリガンドへとコンジュゲートされる。

【０１４４】

リンカー

一部の態様では、ターゲティングリガンドは、介在リンカーを介して、アンカードメイン（例．カチオン性アンカードメイン、アニオン性アンカードメイン）又はペイロードへとコンジュゲートされる。リンカーは、タンパク質リンカーの場合もあり、非タンパク質リンカーの場合もある。リンカーは、一部の場合、安定性の一助となる場合もあり、補体の活性化を防止する場合もあり、及び／又はアンカードメインと比べてリガンドに可撓性をもたらす場合もある。

【０１４５】

ターゲティングリガンドとリンカーのコンジュゲーション、又はリンカーとアンカードメインのコンジュゲーションは、多数の異なる方式で達せられうる。一部の場合、コンジュゲーションは、スルフヒドリル化学反応（例えば２つのシステイン残基の間の、例えばジスルフィド結合）を介する。一部の場合、コンジュゲーションはアミン反応性化学反応を使用して達せられる。一部の場合、ターゲティングリガンドはシステイン残基を含み、システイン残基を介してリンカーとコンジュゲートし；及び／又はアンカードメインはシステイン残基を含み、システイン残基を介してリンカーとコンジュゲートする。一部の場合、リンカーはペプチドリンカーであり、システイン残基を含む。一部の場合、ターゲティングリガンドとペプチドリンカーは、同じポリペプチドの一部であることによりコンジュゲートされ；及び／又はアンカードメインとペプチドリンカーは、同じポリペプチドの一部であることによりコンジュゲートされる。

【０１４６】

一部の場合、本発明のリンカーはポリペプチドであり、ポリペプチドリンカーと称されうる。ポリペプチドリンカーが想定されるが、一部の場合、非ポリペプチドリンカー（化

学リンカー）も使用されることが理解される。例えば一部の態様では、リンカーはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）リンカーである。適切なタンパク質リンカーは、４アミノ酸～６０アミノ酸長（例．４～５０、４～４０、４～３０、４～２５、４～２０、４～１５、４～１０、６～６０、６～５０、６～４０、６～３０、６～２５、６～２０、６～１５、６～１０、８～６０、８～５０、８～４０、８～３０、８～２５、８～２０又は８～１５アミノ酸長）のポリペプチドを含む。

【０１４７】

一部の態様では、本発明のリンカーは非可撓性である（例．１つ以上のプロリン残基を含むリンカー）。非可撓性リンカーの１つの非限定的な例は、ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ（配列番号１７）である。一部の場合、ポリペプチドリンカーはＮ末端又はＣ末端にＣ残基を含む。したがって一部の場合には、非可撓性リンカーはＧＡＰＧＡＰＧＡＰＣ（配列番号１８）及びＣＧＡＰＧＡＰＧＡＰ（配列番号１９）から選択される。

【０１４８】

ある程度の可撓性を伴うペプチドリンカーが使用されうる。したがって一部の場合、本発明のリンカーは可撓性である。可撓性のリンカーは一般的に可撓性のペプチドをもたらす配列を有することを念頭に置き、連結ペプチドは事実上任意のアミノ酸配列を有してもよい。小型のアミノ酸、例えば、グリシン及びアラニンの使用は、可撓性ペプチドの作製において有用である。このような配列の調製は当業者にとって日常的な作業である。さまざまな異なるリンカーが市販されており、使用に適すると考えられる。代表的なリンカーポリペプチドは、グリシンポリマー（Ｇ）$_n$、グリシン－セリンポリマー（例．（ＧＳ）、ＧＳＧＧＳ$_n$（配列番号２０を含む）、ＧＧＳＧＧＳ$_n$（配列番号２１）及びＧＧＧＳ$_n$（配列番号２２）［配列中、ｎは１以上の整数］）、グリシン－アラニンポリマー、アラニン－セリンポリマーを含む。代表的なリンカーは、ＧＧＳＧ（配列番号２３）、ＧＧＳＧＧ（配列番号２４）、ＧＳＧＳＧ（配列番号２５）、ＧＳＧＧＧ（配列番号２６）、ＧＧＧＳＧ（配列番号２７）、ＧＳＳＳＧ（配列番号２８）などを含むが、これらに限定されないアミノ酸配列を含みうる。当業者は、上述した任意の要素とコンジュゲートするペプチドの設計が、全て又は部分的に可撓性のリンカーを含む可能性があり、その結果、リンカーは、可撓性のリンカー及びあまり可撓性でない構造の１つ以上の部分を含み得ることを認識するであろう。可撓性リンカーの他の例には、ＧＧＧＧＧＳＧＧＧＧＧ（配列番号２９）及びＧＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号３０）が含まれるが、これらに限定されない。上述したように、一部の場合、ポリペプチドリンカーはＮ末端又はＣ末端にＣ残基を含む。したがって一部の場合、可撓性リンカーは、ＧＧＧＧＧＳＧＧＧＧＧＣ（配列番号３１）、ＣＧＧＧＧＧＳＧＧＧＧＧ（配列番号３２）、ＧＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＣ（配列番号３３）及びＣＧＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号３４）から選択されるアミノ酸配列を含む。

【０１４９】

一部の場合、本発明のポリペプチドリンカーはエンドソーム溶解性である。エンドソーム溶解性ポリペプチドリンカーは、ＫＡＬＡ（配列番号３５）及びＧＡＬＡ（配列番号３６）を含むが、これらに限定されない。上述したように、一部の場合、ポリペプチドリンカーはＮ末端又はＣ末端にＣ残基を含む。したがって一部の場合、本発明のリンカーは、ＣＫＡＬＡ（配列番号３７）、ＫＡＬＡＣ（配列番号３８）、ＣＧＡＬＡ（配列番号３９）及びＧＡＬＡＣ（配列番号４０）から選択されるアミノ酸配列を含む。

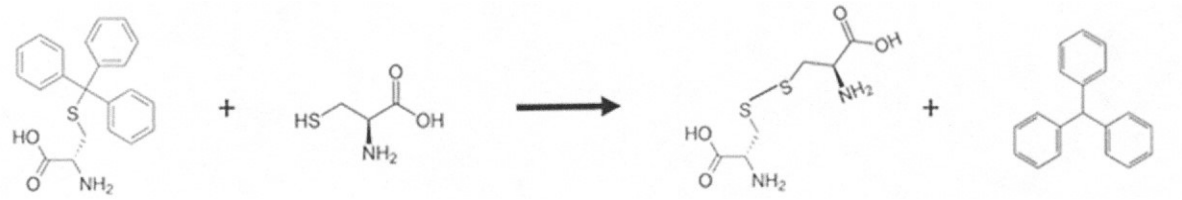
【０１５０】

スルフヒドリルカップリング反応の代表的な例

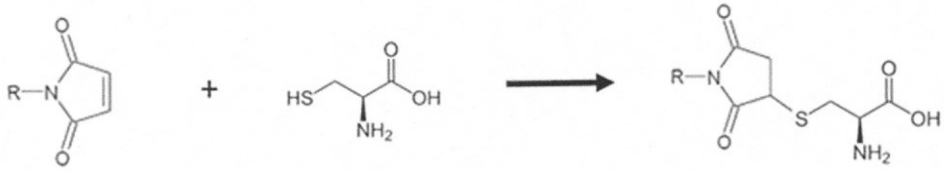
（例えばシステイン残基を使用する、例えばスルフヒドリル化学反応を介するコンジュゲーションのための反応）

（例えば、ターゲティングリガンド又は糖ペプチドをリンカーへとコンジュゲートするため、ターゲティングリガンド又は糖ペプチドをアンカードメイン（例．カチオン性アンカードメイン）へとコンジュゲートするため、リンカーをアンカードメイン（例．カチオン性アンカードメイン）へとコンジュゲートするためなどの反応）

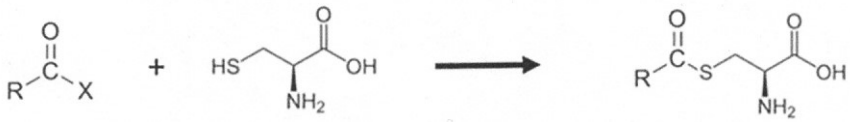
【０１５１】
ジスルフィド結合
遊離スルフヒドリル基を含有する還元状態下のシステイン残基は、典型的なジスルフィド交換反応において保護されたチオールとのジスルフィド結合をたやすく形成する。
【０１５２】
【化５】



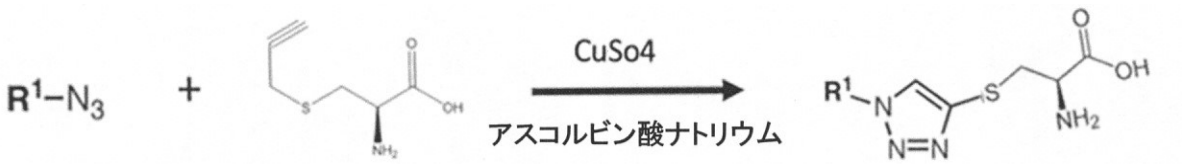
【０１５３】
チオエーテル／チオエステル結合
システインのスルフヒドリル基はマレイミド及びハロゲン化アシル基と反応し、それぞれ、安定的なチオエーテル及びチオエステル結合を形成する。
【０１５４】
【化６】
マレイミド



【０１５５】
【化７】
ハロゲン化アシル



【０１５６】
アジド－アルキン環化付加
この結合は、アルキン結合を含むようにシステイン残基を化学修飾することにより、又は合成ペプチド調製（例．固相合成）におけるL-プロパルギルアミノ酸誘導体（例．L-プロパルギルシステイン（下記に図解される））の使用により、促進する。次いで、カップリングはＣｕ促進型クリック化学反応により達成される。
【０１５７】
【化８】



【０１５８】
ターゲティングリガンドの例
ターゲティングリガンドの例は、以下のアミノ酸配列：
ＳＣＦ（ｃ－Ｋｉｔ受容体をターゲティングする／これに結合する）
ＥＧＩＣＲＮＲＶＴＮＮＶＫＤＶＴＫＬＶＡＮＬＰＫＤＹＭＩＴＬＫＹＶＰＧＭＤＶＬＰ
ＳＨＣＷＩＳＥＭＶＶＱＬＳＤＳＬＴＤＬＬＤＫＦＳＮＩＳＥＧＬＳＮＹＳＩＩＤＫＬＶ

ＮＩＶＤＤＬＶＥＣＶＫＥＮＳＳＫＤＬＫＫＳＦＫＳＰＥＰＲＬＦＴＰＥＥＦＦＲＩＦＮＲＳＩＤＡＦＫＤＦＶＶＡＳＥＴＳＤＣＶＶＳＳＴＬＳＰＥＫＤＳＲＶＳＶＴＫＰＦＭＬＰＰＶＡ（配列番号１８４）；

ＣＤ７０（ＣＤ２７をターゲティングする／これに結合する）

ＰＥＥＧＳＧＣＳＶＲＲＲＰＹＧＣＶＬＲＡＡＬＶＰＬＶＡＧＬＶＩＣＬＶＶＣＩＱＲＦＡＱＡＱＱＱＬＰＬＥＳＬＧＷＤＶＡＥＬＱＬＮＨＴＧＰＱＱＤＰＲＬＹＷＱＧＧＰＡＬＧＲＳＦＬＨＧＰＥＬＤＫＧＱＬＲＩＨＲＤＧＩＹＭＶＨＩＱＶＴＬＡＩＣＳＳＴＴＡＳＲＨＨＰＴＴＬＡＶＧＩＣＳＰＡＳＲＳＩＳＬＬＲＬＳＦＨＱＧＣＴＩＡＳＱＲＬＴＰＬＡＲＧＤＴＬＣＴＮＬＴＧＴＬＬＰＳＲＮＴＤＥＴＦＦＧＶＱＷＶＲＰ（配列番号１８５）；及び

ＳＨ２ドメイン含有タンパク質１Ａ（ＳＨ２Ｄ１Ａ）（ＣＤ１５０をターゲティングする／これに結合する）

ＳＳＧＬＶＰＲＧＳＨＭＤＡＶＡＶＹＨＧＫＩＳＲＥＴＧＥＫＬＬＬＡＴＧＬＤＧＳＹＬＬＲＤＳＥＳＶＰＧＶＹＣＬＣＶＬＹＨＧＹＩＹＴＹＲＶＳＱＴＥＴＧＳＷＳＡＥＴＡＰＧＶＨＫＲＹＦＲＫＩＫＮＬＩＳＡＦＱＫＰＤＱＧＩＶＩＰＬＱＹＰＶＥＫＫＳＳＡＲＳＴＱＧＴＴＧＩＲＥＤＰＤＶＣＬＫＡＰ（配列番号１８６）

を含むターゲティングリガンドを含むが、これらに限定されない。

【０１５９】

したがって、ターゲティングリガンド（単独で、又は他のターゲティングリガンドと組み合わせて使用されうる）の非限定的な例は、

【０１６０】

【化９】

9R-SCF

RRRRRRRRR*M*EGICRNRVTNNVKDVTKLVANLPKDYMITLKYVPGMDVLPSHCWISEMV
VQLSDSLTDLLDKFSNISEGLSNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENSSKDLKKSFKSPEPRLFTP
EEFFRIFNRSIDAFKDFVVASETSDCVVSSTLSPEKDSRVSVTKPFMLPPVA （配列番号
１８９）

9R-CD70

RRRRRRRRRPEEGSGCSVRRRPYGCVLRAALVPLVAGLVICLVVCIQRFAQAQQQLPLE
SLGWDVAELQLNHTGPQQDPRLYWQGGPALGRSFLHGPELDKGQLRIHRDGIYMVHIQV
TLAICSSTTASRHHPTTLAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDTLCTNLT
GTLLPSRNTDETFFGVQWVRP （配列番号１９０）

CD70-9R

PEEGSGCSVRRRPYGCVLRAALVPLVAGLVICLVVCIQRFAQAQQQLPLESLGWDVAEL
QLNHTGPQQDPRLYWQGGPALGRSFLHGPELDKGQLRIHRDGIYMVHIQVTLAICSSTTA
SRHHPTTLAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDTLCTNLTGTLLPSRNTD
ETFFGVQWVRP**RRRRRRRRR** （配列番号１９１）

6H-SH2D1A

*MGSS***HHHHHH***SSGLVPRGSH*MDAVAVYHGKISRETGEKLLLATGLDGSYLLRDSESVPG
VYCLCVLYHGYIYTYRVSQTETGSWSAETAPGVHKRYFRKIKNLISAFQKPDQGIVIPLQY
PVEKKSSARSTQGTTGIREDPDVCLKAP （配列番号１９２）

6H-SH2D1A

RRRRRRRRR*SSGLVPRGSH*MDAVAVYHGKISRETGEKLLLATGLDGSYLLRDSESVPGV
YCLCVLYHGYIYTYRVSQTETGSWSAETAPGVHKRYFRKIKNLISAFQKPDQGIVIPLQYP
VEKKSSARSTQGTTGIREDPDVCLKAP （配列番号１９３）

【０１６１】

を含む。

【０１６２】

送達分子及び構成要素の代表的な例

（０ａ）システインコンジュゲーションアンカー１（ＣＣＡ１）

［アンカードメイン（例．カチオン性アンカードメイン）－リンカー（ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ）－システイン］

ＲＲＲＲＲＲＲＲＲ　ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ　Ｃ（配列番号４１）

（０ｂ）システインコンジュゲーションアンカー２（ＣＣＡ２）

［システイン－リンカー（ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ）－アンカードメイン（例．カチオン性アンカードメイン）］

Ｃ　ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ　ＲＲＲＲＲＲＲＲＲ（配列番号４２）

【０１６３】

（１ａ）α５β１リガンド
［アンカードメイン（例．カチオン性アンカードメイン）－リンカー（ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ）－ターゲティングリガンド］
ＲＲＲＲＲＲＲＲＲ　ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ　ＲＲＥＴＡＷＡ（配列番号４５）
（１ｂ）α５β１リガンド
［ターゲティングリガンド－リンカー（ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ）－アンカードメイン（例．カチオン性アンカードメイン）］
ＲＲＥＴＡＷＡ　ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ　ＲＲＲＲＲＲＲＲＲ（配列番号４６）
（１ｃ）α５β１リガンド（左Ｃｙｓ）
ＣＧＡＰＧＡＰＧＡＰ（配列番号１９）
注：これは、スルフヒドリル化学反応（例．ジスルフィド結合）又はアミン反応性化学反応を介してＣＣＡ１（上記参照）とコンジュゲートできる。
（１ｄ）α５β１リガンド（右Ｃｙｓ）
ＧＡＰＧＡＰＧＡＰＣ（配列番号１８）
注：これは、スルフヒドリル化学反応（例．ジスルフィド結合）又はアミン反応性化学反応を介してＣＣＡ２（上記参照）とコンジュゲートできる。
【０１６４】
（２ａ）ＲＧＤ α５β１リガンド
［アンカードメイン（例．カチオン性アンカードメイン）－リンカー（ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ）－ターゲティングリガンド］
ＲＲＲＲＲＲＲＲＲ　ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ　ＲＧＤ（配列番号４７）
（２ｂ）ＲＧＤ ａ５ｂ１リガンド
［ターゲティングリガンド－リンカー（ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ）－アンカードメイン（例．カチオン性アンカードメイン）］
ＲＧＤ　ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ　ＲＲＲＲＲＲＲＲＲ（配列番号４８）
（２ｃ）ＲＧＤリガンド（左Ｃｙｓ）
ＣＲＧＤ（配列番号４９）
注：これは、スルフヒドリル化学反応（例．ジスルフィド結合）又はアミン反応性化学反応を介してＣＣＡ１（上記参照）とコンジュゲートできる。
（２ｄ）ＲＧＤリガンド（右Ｃｙｓ）
ＲＧＤＣ（配列番号５０）
注：これは、スルフヒドリル化学反応（例．ジスルフィド結合）又はアミン反応性化学反応を介してＣＣＡ２（上記参照）とコンジュゲートできる。
【０１６５】
（３ａ）トランスフェリンリガンド
［アンカードメイン（例．カチオン性アンカードメイン）－リンカー（ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ）－ターゲティングリガンド］
ＲＲＲＲＲＲＲＲＲ　ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ　ＴＨＲＰＰＭＷＳＰＶＷＰ（配列番号５１）
（３ｂ）トランスフェリンリガンド
［ターゲティングリガンド－リンカー（ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ）－アンカードメイン（例．カチオン性アンカードメイン）］
ＴＨＲＰＰＭＷＳＰＶＷＰ　ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ　ＲＲＲＲＲＲＲＲＲ（配列番号５２）
（３ｃ）トランスフェリンリガンド（左Ｃｙｓ）
ＣＴＨＲＰＰＭＷＳＰＶＷＰ（配列番号５３）
ＣＰＴＨＲＰＰＭＷＳＰＶＷＰ（配列番号５４）
注：これは、スルフヒドリル化学反応（例．ジスルフィド結合）又はアミン反応性化学反応を介してＣＣＡ１（上記参照）とコンジュゲートできる。
（３ｄ）トランスフェリンリガンド（右Ｃｙｓ）

ＴＨＲＰＰＭＷＳＰＶＷＰＣ（配列番号５５）
注：これは、スルフヒドリル化学反応（例．ジスルフィド結合）又はアミン反応性化学反応を介してＣＣＡ２（上記参照）とコンジュゲートできる。
【０１６６】
（４ａ）E-セレクチンリガンド［１～２１］
［アンカードメイン（例．カチオン性アンカードメイン）－リンカー（ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ）－ターゲティングリガンド］
ＲＲＲＲＲＲＲＲＲ　ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ　ＭＩＡＳＱＦＬＳＡＬＴＬＶＬＬＩＫＥＳＧＡ（配列番号５６）
（４ｂ）E-セレクチンリガンド［１～２１］
［ターゲティングリガンド－リンカー（ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ）－アンカードメイン（例．カチオン性アンカードメイン）］
ＭＩＡＳＱＦＬＳＡＬＴＬＶＬＬＩＫＥＳＧＡ　ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ　ＲＲＲＲＲＲＲＲＲ（配列番号５７）
（４ｃ）E-セレクチンリガンド［１～２１］（左Ｃｙｓ）
ＣＭＩＡＳＱＦＬＳＡＬＴＬＶＬＬＩＫＥＳＧＡ（配列番号５８）
注：これは、スルフヒドリル化学反応（例．ジスルフィド結合）又はアミン反応性化学反応を介してＣＣＡ１（上記参照）とコンジュゲートできる。
（４ｄ）E-セレクチンリガンド［１～２１］（右Ｃｙｓ）
ＭＩＡＳＱＦＬＳＡＬＴＬＶＬＬＩＫＥＳＧＡＣ（配列番号５９）
注：これは、スルフヒドリル化学反応（例．ジスルフィド結合）又はアミン反応性化学反応を介してＣＣＡ２（上記参照）とコンジュゲートできる。
【０１６７】
（５ａ）ＦＧＦ断片［２６～４７］
［アンカードメイン（例．カチオン性アンカードメイン）－リンカー（ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ）－ターゲティングリガンド］
ＲＲＲＲＲＲＲＲＲ　ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ　ＫＮＧＧＦＦＬＲＩＨＰＤＧＲＶＤＧＶＲＥＫＳ（配列番号６０）
注：これは、スルフヒドリル化学反応（例．ジスルフィド結合）又はアミン反応性化学反応を介してＣＣＡ１（上記参照）とコンジュゲートできる。
（５ｂ）ＦＧＦ断片［２６～４７］
［ターゲティングリガンド－リンカー（ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ）－アンカードメイン（例．カチオン性アンカードメイン）］
ＫＮＧＧＦＦＬＲＩＨＰＤＧＲＶＤＧＶＲＥＫＳ　ＧＡＰＧＡＰＧＡＰ　ＲＲＲＲＲＲＲＲＲ（配列番号６１）
注：これは、スルフヒドリル化学反応（例．ジスルフィド結合）又はアミン反応性化学反応を介して、ＣＣＡ１（上記参照）へとコンジュゲートされうる。
（５ｃ）ＦＧＦ断片［２５～４７］（左Ｃｙｓが天然である）
ＣＫＮＧＧＦＦＬＲＩＨＰＤＧＲＶＤＧＶＲＥＫＳ（配列番号４３）
注：これは、スルフヒドリル化学反応（例．ジスルフィド結合）又はアミン反応性化学反応を介してＣＣＡ１（上記参照）とコンジュゲートできる。
（５ｄ）ＦＧＦ断片［２６～４７］（右Ｃｙｓ）
ＫＮＧＧＦＦＬＲＩＨＰＤＧＲＶＤＧＶＲＥＫＳＣ（配列番号４４）
注：これは、スルフヒドリル化学反応（例．ジスルフィド結合）又はアミン反応性化学反応を介してＣＣＡ２（上記参照）とコンジュゲートできる。
【０１６８】
（６ａ）エキセンディン（Ｓ１１Ｃ）［１～３９］
ＨＧＥＧＴＦＴＳＤＬＣＫＱＭＥＥＥＡＶＲＬＦＩＥＷＬＫＮＧＧＰＳＳＧＡＰＰＰＳ（配列番号２）
注：これは、スルフヒドリル化学反応（例．ジスルフィド結合）又はアミン反応性化学反

応を介してＣＣＡ１（上記参照）へとコンジュゲートできる。

【０１６９】

ターゲティングリガンド

（例えば、対象を送達する分子の一部としての、例えば、ナノ粒子の一部としての）さまざまなターゲティングリガンドが使用される可能性があり、多数の異なるターゲティングリガンドが想定される。一部の態様では、ターゲティングリガンドは、野生型タンパク質の断片（例．結合性ドメイン）である。例えば一部の場合、対象を送達する分子のペプチドであるターゲティングリガンドは、４～５０アミノ酸（例．４～４０、４～３５、４～３０、４～２５、４～２０、４～１５、５～５０、５～４０、５～３５、５～３０、５～２５、５～２０、５～１５、７～５０、７～４０、７～３５、７～３０、７～２５、７～２０、７～１５、８～５０、８～４０、８～３５、８～３０、８～２５、８～２０又は８～１５アミノ酸）の長さを有しうる。ターゲティングリガンドは野生型タンパク質の断片でありうるが、一部の場合、野生型アミノ酸配列と比べた突然変異（例．挿入、欠失、置換）（すなわち、対応する野生型タンパク質配列と比べた突然変異）を有する。例えば、ターゲティングリガンドは、標的細胞の表面タンパク質に対する結合アフィニティーを増大又は減少させる突然変異を含みうる。

【０１７０】

一部の場合、ターゲティングリガンドは抗体（Ｆ（ａｂ））の抗原結合性領域である。一部の場合、ターゲティングリガンドはＳｃＦｖである。「Ｆｖ」とは、完全な抗原認識／結合性部位を含有する最小の抗体断片である。二本鎖Ｆｖ分子種では、この領域は、緊密な非共有結合的会合下にある１つの重鎖／１つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。単鎖Ｆｖ分子種（ｓｃＦｖ）では、軽鎖と重鎖が二本鎖Ｆｖ分子種内の「二量体」構造と類似の「二量体」構造下で会合しうるように、１つの重鎖／１つの軽鎖可変ドメインは可撓性ペプチドリンカーで共有結合的に連結されうる。ｓｃＦｖの総説については、Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)参照。

【０１７１】

一部の場合、ターゲティングリガンドは、一部の場合、遍在的な表面マーカー、例えば、ヘパリン硫酸プロテオグリカンに結合し、膜波打ち関連過程を介して、一部の細胞集団内でミクロピノサイトーシス（及び／又はマクロピノサイトーシス）を誘導しうるウイルス性糖タンパク質を含む。ポリ（L-アルギニン）は、これもまた、表面マーカー、例えば、ヘパリン硫酸プロテオグリカンへの結合に使用されうる別の代表的なターゲティングリガンドである。

【０１７２】

一部の場合、静電的に、又は粒子表面への共有結合的修飾若しくは粒子表面上の１つ以上のポリマーを利用して、粒子表面（例．ナノ粒子表面）はターゲティングリガンドでコーティングされる。一部の場合、ターゲティングリガンドは、リンカー及び／又はアンカードメイン（例．カチオン性アンカードメイン）とのコンジュゲーションを促進しうるシステイン残基を付加する突然変異を含みうる。例えば、システインはスルフヒドリル化学反応（例．ジスルフィド結合）及び／又はアミン反応性化学反応を介する架橋（コンジュゲーション）のために使用されうる。

【０１７３】

一部の場合、ターゲティングリガンドは内部システイン残基を含む。一部の場合、ターゲティングリガンドは、Ｎ及び／又はＣ末端にシステイン残基を含む。一部の場合、システイン残基を含むために、ターゲティングリガンドは、例えば対応する野生型配列と比べて、突然変異（例．挿入又は置換）を導入される。このように、本明細書に記載のターゲティングリガンドのうちのいずれかは、システイン残基を挿入すること、及び／又はこれで置換すること（例えば、内部、Ｎ末端、Ｃ末端における、システイン残基の挿入、又はこれによる置換）により修飾されうる。

【０１７４】

「対応する」野生型配列とは、対象となる配列が由来したか、又は由来した可能性がある野生型配列（例．目的の配列に対する高度の配列同一性を有する野生型タンパク質配列）を意味する。一部の場合、「対応する」野生型配列とは、目的のアミノ酸配列と８５％以上の配列同一性（例．９０％以上、９２％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上又は１００％の配列同一性）を有する野生型配列である。例えば、１つ以上の突然変異（例．置換、挿入）を有するが、野生型配列と他の形で高度に類似するターゲティングリガンドに対して最も類似するアミノ酸配列は、対応する野生型アミノ酸配列であると考えられてもよい。

【０１７５】

対応する野生型タンパク質／配列は、１００％同一である（例えば、８５％以上同一、９０％以上同一、９５％以上同一、９８％以上同一、９９％以上同一などでありうる）（修飾される位置以外で）必要はないが、ターゲティングリガンド、及び対応する野生型タンパク質（例．野生型タンパク質の断片）は、意図される細胞表面タンパク質に結合することが可能であり、それらが相同であると考えられるのに十分な配列同一性（修飾される領域外における）を保持しうる。「対応する」野生型タンパク質配列のアミノ酸配列は、任意の好都合な方法を使用して（例えば任意の好都合な配列比較／アライメントソフトウェア（例．BLAST、MUSCLE、T-COFFEEなど）を使用して）同定／査定されうる。

【０１７６】

表面コートの一部として（例．表面コートの送達分子の一部として）使用されうるターゲティングリガンドの例は、表１に列挙されたターゲティングリガンドを含むが、これらに限定されない。対象を送達する分子の一部として使用されうるターゲティングリガンドの例は、表３に列挙されたターゲティングリガンド（表３に列挙された配列の多くは、例えば、リンカー（例.ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ）を介して、カチオン性ポリペプチドドメイン、例えば、９Ｒ、６Ｒへとコンジュゲートされたターゲティングリガンド（例えば、２行目のＳＮＲＷＬＤＶＫ）を含む）を含むが、これらに限定されない。ターゲティングリガンド内に含まれうるアミノ酸配列の例は、ＮＰＫＬＴＲＭＬＴＦＫＦＹ（配列番号ｘｘ）（ＩＬ２）、ＴＳＶＧＫＹＰＮＴＧＹＹＧＤ（配列番号ｘｘ）（ＣＤ３）、ＳＮＲＷＬＤＶＫ（Siglec）、ＥＫＦＩＬＫＶＲＰＡＦＫＡＶ（配列番号ｘｘ）（ＳＣＦ）；ＥＫＦＩＬＫＶＲＰＡＦＫＡＶ（配列番号ｘｘ）（ＳＣＦ）、ＥＫＦＩＬＫＶＲＰＡＦＫＡＶ（配列番号ｘｘ）（ＳＣＦ）、ＳＮＹＳＩＩＤＫＬＶＮＩＶＤＤＬＶＥＣＶＫＥＮＳ（配列番号ｘｘ）（ｃＫｉｔ）及びＡｃ－ＳＮＹＳＡｉｂＡＤＫＡｉｂＡＮＡｉｂＡＤＤＡｉｂＡＥＡｉｂＡＫＥＮＳ（配列番号ｘｘ）（ｃＫｉｔ）を含むが、これらに限定されない。したがって一部の場合、ターゲティングリガンドは、ＮＰＫＬＴＲＭＬＴＦＫＦＹ（配列番号ｘｘ）（ＩＬ２）、ＴＳＶＧＫＹＰＮＴＧＹＹＧＤ（配列番号ｘｘ）（ＣＤ３）、ＳＮＲＷＬＤＶＫ（Siglec）、ＥＫＦＩＬＫＶＲＰＡＦＫＡＶ（配列番号ｘｘ）（ＳＣＦ）；ＥＫＦＩＬＫＶＲＰＡＦＫＡＶ（配列番号ｘｘ）（ＳＣＦ）、ＥＫＦＩＬＫＶＲＰＡＦＫＡＶ（配列番号ｘｘ）（ＳＣＦ）、又はＳＮＹＳＩＩＤＫＬＶＮＩＶＤＤＬＶＥＣＶＫＥＮＳ（配列番号ｘｘ）（ｃＫｉｔ）と８５％以上（例．９０％以上、９５％以上、９８％以上、９９％以上又は１００％）の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０１７７】

【表１－１】

表1:ターゲティングリガンドの例

細胞表面タンパク質	ターゲティングリガンド	配列	配列番号
GPCRファミリーB	エキセンディン	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS	1
	エキセンディン(S11C)	HGEGTFTSDLCKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS	2
FGF受容体	FGF断片	KRLYCKNGGFFLRIHPDGRVDGVREKSDPHIKLQLQAEERGVVSIKGVCANRYLAMKEDGRLLASKCVTDECFFFERLESNNYNTY	3
	FGF断片	KNGGFFLRIHPDGRVDGVREKS	4
	FGF断片	HFKDPK	5
	FGF断片	LESNNYNT	6
	E-セレクチン	MIASQFLSALTLVLLIKESGA	7
	L-セレクチン	MVFPWRCEGTYWGSRNILKLWVWTLLCCDFLIHHGTHC	8
		MIFPWKCQSTQRDLWNIFKLWGWTMLCCDFLAHHGTDC	9
		MIFPWKCQSTQRDLWNIFKLWGWTMLCC	10
P-セレクチン	PSGL-1(SELPLG)	MAVGASGLEGDKMAGAMPLQLLLLLILLGPGNSLQLWDTWADEAEKALGPLLARDRRQATEYEYLDYDFLPETEPPEMLRNSTDTTPLTGPGTPESTTVEPAARRSTGLDAGGAVTELTTELANMGNLSTDSAAMEIQTTQPAATEAQTTQPVPTEAQTTPLAATEAQTTRLTATEAQTTPLAATEAQTTPPAATEAQTTQPTGLEAQTTAPAAMEAQTTAPAAMEAQTTPPAAMEAQTTQTTAMEAQTTAPEATEAQTTQPTATEAQTTPLAAMEALSTEPSATEALSMEPTTKRGLFIPFSVSSVTHKGIPMAASNLSVNYPVGAPDHISVKQCLLAILILALVATIFFVCTVVLAVRLSRKGHMYPVRNYSPTEMVCISSLLPDGGEGPSATANGGLSKAKSPGLTPEPREDREGDDLTLHSFLP	271

【０１７８】

【表１－２】

細胞表面タンパク質	ターゲティングリガンド	配列	配列番号
E-セレクチン	ESL-1 (GLG1)	MAACGRVRRMFRLSAALHLLLLFAAGAEKLPGQ GVHSQGQGPGANFVSFVGQAGGGGPAGQQLP QLPQSSQLQQQQQQQQQQQQPQPPQPPFPAG GPPARRGGAGAGGGWKLAEEESCREDVTRVC PKHTWSNNLAVLECLQDVREPENEISSDCNHLL WNYKLNLTTDPKFESVAREVCKSTITEIKECADE PVGKGYMVSCLVDHRGNITEYQCHQYITKMTAII FSDYRLICGFMDDCKNDINILKCGSIRLGEKDAHS QGEVVSCLEKGLVKEAEEREPKIQVSELCKKAIL RVAELSSDDFHLDRHLYFACRDDRERFCENTQA GEGRVYKCLFNHKFEESMSEKCREALTTRQKLIA QDYKVSYSLAKSCKSDLKKYRCNVENLPRSREA RLSYLLMCLESAVHRGRQVSSECQGEMLDYRR MLMEDFSLSPEIILSCRGEIEHHCSGLHRKGRTL HCLMKVVRGEKGNLGMNCQQALQTLIQETDPG ADYRIDRALNEACESVIQTACKHIRSGDPMILSCL MEHLYTEKMVEDCEHRLLELQYFISRDWKLDPV LYRKCQGDASRLCHTHGWNETSEFMPQGAVFS CLYRHAYRTEEQGRRLSRECRAEVQRILHQRAM DVKLDPALQDKCLIDLGKWCSEKTETGQELECL QDHLDDLVVECRDIVGNLTELESEDIQIEALLMRA CEPIIQNFCHDVADNQIDSGDLMECLIQNKHQKD MNEKCAIGVTHFQLVQMKDFRFSYKFKMACKED VLKLCPNIKKKVDVVICLSTTVRNDTLQEAKEHRV SLKCRRQLRVEELEMTEDIRLEPDLYEACKSDIK NFCSAVQYGNAQIIECLKENKKQLSTRCHQKVFK LQETEMMDPELDYTLMRVCKQMIKRFCPEADSK TMLQCLKQNKNSELMDPKCKQMITKRQITQNTD YRLNPMLRKACKADIPKFCHGILTKAKDDSELEG QVISCLKLRYADQRLSSDCEDQIRIIIQESALDYRL DPQLQLHCSDEISSLCAEEAAAQEQTGQVEECL KVNLLKIKTELCKKEVLNMLKESKADIFVDPVLHT ACALDIKHHCAAITPGRGRQMSCLMEALEDKRV RLQPECKKRLNDRIEMWSYAAKVAPADGFSDLA MQVMTSPSKNYILSVISGSICILFLIGLMCGRITKR VTRELKDRLQYRSETMAYKGLVWSQDVTGSPA	272
	PSGL-1 (SELPLG)	上記参照	271

【０１７９】

【表１－３】

細胞表面タンパク質	ターゲティングリガンド	配列	配列番号
	CD44	MDKFWWHAAWGLCLVPLSLAQIDLNITCRFAGV FHVEKNGRYSISRTEAADLCKAFNSTLPTMAQM EKALSIGFETCRYGFIEGHVVIPRIHPNSICAANNT GVYILTSNTSQYDTYCFNASAPPEEDCTSVTDLP NAFDGPITITIVNRDGTRYVQKGEYRTNPEDIYPS NPTDDDVSSGSSSERSSTSGGYIFYTFSTVHPIP DEDSPWITDSTDRIPATTLMSTSATATETATKRQ ETWDWFSWLFLPSESKNHLHTTTQMAGTSSNTI SAGWEPNEENEDERDRHLSFSGSGIDDDEDFIS STISTTPRAFDHTKQNQDWTQWNPSHSNPEVLL QTTTRMTDVDRNGTTAYEGNWNPEAHPPLIHHE HHEEEETPHSTSTIQATPSSTTEETATQKEQWF GNRWHEGYRQTPKEDSHSTTGTAAASAHTSHP MQGRTTPSPEDSSWTDFFNPISHPMGRGHQAG RRMDMDSSHSITLQPTANPNTGLVEDLDRTGPL SMTTQQSNSQSFSTSHEGLEEDKDHPTTSTLTS SNRNDVTGGRRDPNHSEGSTTLLEGYTSHYPHT KESRTFIPVTSAKTGSFGVTAVTVGDSNSNVNRS LSGDQDTFHPSGGSHTTHGSESDGHSHGSQEG GANTTSGPIRTPQIPEWLIILASLLALALILAVCIAV NSRRRCGQKKKLVINSGNGAVEDRKPSGLNGEA SKSQEMVHLVNKESSETPDQFMTADETRNLQNV DMKIGV	273
	DR3 (TNFRSF25)	MEQRPRGCAAVAAALLLVLLGARAQGGTRSPR CDCAGDFHKKIGLFCCRGCPAGHYLKAPCTEPC GNSTCLVCPQDTFLAWENHHNSECARCQACDE QASQVALENCSAVADTRCGCKPGWFVECQVSQ CVSSSPFYCQPCLDCGALHRHTRLLCSRRDTDC GTCLPGFYEHGDGCVSCPTPPPSLAGAPWGAV QSAVPLSVAGGRVGVFWVQVLLAGLVVPLLLGA TLTYTYRHCWPHKPLVTADEAGMEALTPPPATH LSPLDSAHTLLAPPDSSEKICTVQLVGNSWTPGY PETQEALCPQVTWSWDQLPSRALGPAAAPTLSP ESPAGSPAMMLQPGPQLYDVMDAVPARRWKEF VRTLGLREAEIEAVEVEIGRFRDQQYEMLKRWR QQQPAGLGAVYAALERMGLDGCVEDLRSRLQR GP	274

【０１８０】

【表１－４】

細胞表面タンパク質	ターゲティングリガンド	配列	配列番号
	LAMP1	MAAPGSARRPLLLLLLLLLLGLMHCASAAMFMVKN GNGTACIMANFSAAFSVNYDTKSGPKNMTFDLPS DATVVLNRSSCGKENTSDPSLVIAFGRGHTLTLNF TRNATRYSVQLMSFVYNLSDTHLFPNASSKEIKTV ESITDIRADIDKKYRCVSGTQVHMNNVTVTLHDATI QAYLSNSSFSRGETRCEQDRPSPTTAPPAPPSPS PSPVPKSPSVDKYNVSGTNGTCLLASMGLQLNLT YERKDNTTVTRLLNINPNKTSASGSCGAHLVTLEL HSEGTTVLLFQFGMNASSSRFFLQGIQLNTILPDA RDPAFKAANGSLRALQATVGNSYKCNAEEHVRVT KAFSVNIFKVWVQAFKVEGGQFGSVEECLLDENS MLIPIAVGGALAGLVLIVLIAYLVGRKRSHAGYQTI	275
	LAMP2	MVCFRLFPVPGSGLVLVCLVLGAVRSYALELNLTD SENATCLYAKWQMNFTVRYETTNKTYKTVTISDH GTVTYNGSICGDDQNGPKIAVQFGPGFSWIANFTK AASTYSIDSVSFSYNTGDNTTFPDAEDKGILTVDEL LAIRIPLNDLFRCNSLSTLEKNDVVQHYWDVLVQA FVQNGTVSTNEFLCDKDKTSTVAPTIHTTVPSPTT TPTPKEKPEAGTYSVNNGNDTCLLATMGLQLNITQ DKVASVININPNTTHSTGSCRSHTALLRLNSSTIKY LDFVFAVKNENRFYLKEVNISMYLVNGSVFSIANN NLSYWDAPLGSSYMCNKEQTVSVSGAFQINTFDL RVQPFNVTQGKYSTAQDCSADDDNFLVPIAVGAA LAGVLILVLLAYFIGLKHHHAGYEQF	276
	Mac2-BP（ガレクチン３結合タンパク質）(LGALS3BP)	MTPPRLFWVWLLVAGTQGVNDGDMRLADGGATN QGRVEIFYRGQWGTVCDNLWDLTDASVVCRALG FENATQALGRAAFGQGSGPIMLDEVQCTGTEASL ADCKSLGWLKSNCRHERDAGVVCTNETRSTHTL DLSRELSEALGQIFDSQRGCDLSISVNVQGEDALG FCGHTVILTANLEAQALWKEPGSNVTMSVDAECV PMVRDLLRYFYSRRIDITLSSVKCFHKLASAYGAR QLQGYCASLFAILLPQDPSFQMPLDLYAYAVATGD ALLEKLCLQFLAWNFEALTQAEAWPSVPTDLLQLL LPRSDLAVPSELALLKAVDTWSWGERASHEEVEG LVEKIRFPMMLPEELFELQFNLSLYWSHEALFQKK TLQALEFHTVPFQLLARYKGLNLTEDTYKPRIYTSP TWSAFVTDSSWSARKSQLVYQSRRGPLVKYSSD YFQAPSDYRYYPYQSFQTPQHPSFLFQDKRVSW SLVYLPTIQSCWNYGFSCSSDELPVLGLTKSGGSD RTIAYENKALMLCEGLFVADVTDFEGWKAAIPSAL DTNSSKSTSSFPCPAGHFNGFRTVIRPFYLTNSSG VD	277

【０１８１】

【表１－５】

細胞表面タンパク質	ターゲティングリガンド	配列	配列番号
トランスフェリン受容体	トランスフェリンリガンド	THRPPMWSPVWP	11
α5β1インテグリン	α5β1リガンド	RRETAWA	12
		RGD	
		RGDGW	181
インテグリン	インテグリン結合タンパク質	(Ac)-GCGYGRGDSPG-(NH2)	188
		GCGYGRGDSPG	182
α5β3インテグリン	α5β3リガンド	DGARYCRGDCFDG	187
	狂犬病ウイルス糖タンパク質(RVG)	YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNGGGG	183
c-Kit受容体(CD117)	幹細胞因子(SCF)	EGICRNRVTNNVKDVTKLVANLPKDYMITLKYVPGMDVLPSHCWISEMVVQLSDSLTDLLDKFSNISEGLSNYSIIDKLVNIVDDLVECVKENSSKDLKKSFKSPEPRLFTPEEFFRIFNRSIDAFKDFVVASETSDCVVSSTLSPEKDSRVSVTKPFMLPPVA	184
CD27	CD70	PEEGSGCSVRRRPYGCVLRAALVPLVAGLVICLVVCIQRFAQAQQQLPLESLGWDVAELQLNHTGPQQDPRLYWQGGPALGRSFLHGPELDKGQLRIHRDGIYMVHIQVTLAICSSTTASRHHPTTLAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDTLCTNLTGTLLPSRNTDETFFGVQWVRP	185
CD150	SH2ドメイン含有タンパク質1A(SH2D1A)	SSGLVPRGSHMDAVAVYHGKISRETGEKLLLATGLDGSYLLRDSESVPGVYCLCVLYHGYIYTYRVSQTETGSWSAETAPGVHKRYFRKIKNLISAFQKPDQGIVIPLQYPVEKKSSARSTQGTTGIREDPDVCLKAP	186
IL2R	IL2	NPKLTRMLTFKFY	311
CD3	Cde3-ε	NFYLYRA-NH2	314
CD8	ペプチド-HLA-A*2402	RYPLTFGWCF-NH2	315
CD28	CD80	VVLKYEKDAFKR	316
CD28	CD86	ENLVLNE	319

【０１８２】

（例えば送達分子の）ターゲティングリガンドは、アミノ酸配列ＲＧＤ及び／又は配列番号１～１２のいずれか１つで示されたアミノ酸配列と８５％以上の配列同一性（例．９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上又は１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含みうる。一部の場合、ターゲティングリガ

ンドは、アミノ酸配列ＲＧＤ及び／又は配列番号１～１２のいずれか１つで示されたアミノ酸配列を含む。一部の態様では、ターゲティングリガンドは、（内部、Ｃ末端又はＮ末端の）システインを含むことが可能であり、また、アミノ酸配列ＲＧＤ及び／又は配列番号１～１２のいずれか１つで示されたアミノ酸配列と８５％以上の配列同一性（例．９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上又は１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列も含みうる。

【０１８３】

（例えば送達分子の）ターゲティングリガンドは、アミノ酸配列ＲＧＤ及び／又は配列番号１～１２及び１８１～１８７のいずれか１つで示されたアミノ酸配列と８５％以上の配列同一性（例．９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上又は１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含みうる。一部の場合、ターゲティングリガンドは、アミノ酸配列ＲＧＤ及び／又は配列番号１～１２及び１８１～１８７のいずれか１つで示されたアミノ酸配列を含む。一部の態様では、ターゲティングリガンドは、（内部、Ｃ末端又はＮ末端の）システインを含むことが可能であり、また、アミノ酸配列ＲＧＤ及び／又は配列番号１～１２及び１８１～１８７のいずれか１つで示されたアミノ酸配列と８５％以上の配列同一性（例．９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上又は１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列も含みうる。

【０１８４】

（例えば送達分子の）ターゲティングリガンドは、アミノ酸配列ＲＧＤ及び／又は配列番号１～１２、１８１～１８７及び２７１～２７７のいずれか１つで示されたアミノ酸配列と８５％以上の配列同一性（例．９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上又は１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含みうる。一部の場合、ターゲティングリガンドは、アミノ酸配列ＲＧＤ及び／又は配列番号１～１２、１８１～１８７及び２７１～２７７のいずれか１つで示されたアミノ酸配列を含む。一部の態様では、ターゲティングリガンドは、（内部、Ｃ末端又はＮ末端の）システインを含むことが可能であり、また、アミノ酸配列ＲＧＤ及び／又は配列番号１～１２、１８１～１８７及び２７１～２７７のいずれか１つで示されたアミノ酸配列と８５％以上の配列同一性（例．９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上又は１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列も含みうる。

【０１８５】

一部の場合、（例えば送達分子の）ターゲティングリガンドは、配列番号１８１～１８７及び２７１～２７７のいずれか１つで示されたアミノ酸配列と８５％以上の配列同一性（例．９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上又は１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含みうる。一部の場合、ターゲティングリガンドは、配列番号１８１～１８７及び２７１～２７７のいずれか１つで示されたアミノ酸配列を含む。一部の態様では、ターゲティングリガンドは、（内部、Ｃ末端又はＮ末端の）システインを含むことが可能であり、また、配列番号１８１～１８７及び２７１～２７７のいずれか１つで示されたアミノ酸配列と８５％以上の配列同一性（例．９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上又は１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列も含みうる。

【０１８６】

一部の場合、（例えば送達分子の）ターゲティングリガンドは、配列番号１８１～１８７のいずれか１つで示されたアミノ酸配列と８５％以上の配列同一性（例．９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上又は１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含みうる。一部の場合、ターゲティングリガンドは、配列番号１８１～１８７のいずれか１つで示されたアミノ酸配列を含む。一部の態様では、ターゲティングリガンドは、（内部、Ｃ末端又はＮ末端の）システインを含むことが可能であり、また、配列番号１８１～１８７のいずれか１つで示されたアミノ酸配列と８５％以上の配列同一性（例．９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上

、９９．５％以上又は１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列も含みうる。
【０１８７】
一部の場合、（例えば送達分子の）ターゲティングリガンドは、配列番号２７１～２７７のいずれか１つで示されたアミノ酸配列と８５％以上の配列同一性（例．９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上又は１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含みうる。一部の場合、ターゲティングリガンドは、配列番号２７１～２７７のいずれか１つで示されたアミノ酸配列を含む。一部の態様では、ターゲティングリガンドは、（内部、Ｃ末端又はＮ末端の）システインを含むことが可能であり、また、配列番号２７１～２７７のいずれか１つで示されたアミノ酸配列と８５％以上の配列同一性（例．９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上又は１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列も含みうる。
【０１８８】
本明細書では、「～をターゲティングする」及び「ターゲティングされた結合」は、特異的結合を指すように使用される。「特異的に結合すること」、「～に特異的に結合する」などの用語は、溶液又は反応混合物中の、他の分子又は部分と比べた分子への非共有結合的又は共有結合的な優先的結合を指す（例えば、抗体は、他の結合可能なポリペプチドと比べて、特定のポリペプチド又はエピトープに特異的に結合し、リガンドは、他の結合可能な受容体と比べて、特定の受容体に特異的に結合する）。一部の態様では、１つの分子が特異的に結合する別の分子に対するアフィニティーは、10^{-5}Ｍ以下（例．10^{-6}Ｍ以下、10^{-7}Ｍ以下、10^{-8}Ｍ以下、10^{-9}Ｍ以下、10^{-10}Ｍ以下、10^{-11}Ｍ以下、10^{-12}Ｍ以下、10^{-13}Ｍ以下、10^{-14}Ｍ以下、10^{-15}Ｍ以下又は10^{-16}Ｍ以下）のK_d（解離定数）により特徴付けられる。「アフィニティー」とは結合の強度を指し、結合アフィニティーの増大は低K_dと相関する。
【０１８９】
一部の場合、ターゲティングリガンドは、Ｇタンパク質共役型受容体（ＧＰＣＲ）ファミリーＢ、受容体チロシンキナーゼ（ＲＴＫ）、細胞表面糖タンパク質及び細胞間接着分子から選択される細胞表面タンパク質に対する結合を提供する。受容体へのドッキング時におけるリガンドの空間的配置についての検討は、例えば、ターゲティングリガンドのペイロード又はアンカードメイン（例．カチオン性アンカードメイン）へのコンジュゲーションのために、リガンドと標的との構造機能関係が破壊されないように、所望の機能的選択性及びエンドソーム分取バイアスを達するのに使用されうる。例えば、核酸、タンパク質、リボ核タンパク質又はアンカードメイン（例．カチオン性アンカードメイン）とコンジュゲーションは、クレフトへの結合に潜在的に干渉しうるであろう。
【０１９０】
したがって一部の場合、そのリガンドに結合した所望の標的（細胞表面タンパク質）の結晶構造が入手可能である場合（又はこのような構造が、類縁のタンパク質について入手可能である場合）、３Ｄ構造モデリング及び配列スレッディングを使用してリガンドと標的との相互作用部位を可視化することができる。例えばこれは、（例えばシステイン残基の）置換及び／又は挿入を施す内部部位の選択を容易としうる。
【０１９１】
例として述べると、一部の場合、ターゲティングリガンドはファミリーＢのＧタンパク質共役受容体（ＧＰＣＲ）（また、「セクレチンファミリー」としても公知である）への結合をもたらす。一部の場合、ターゲティングリガンドは、それぞれ、ターゲティングされた結合及び長期エンドソームリサイクリング経路の関与をもたらすファミリーＢのＧＰＣＲのアロステリックアフィニティードメイン及びオーソステリックドメインの両方への結合をもたらす。
【０１９２】
Ｇタンパク質共役受容体（ＧＰＣＲ）は、共通の分子アーキテクチャー（推定の７回膜貫通セグメント）と、それらがＧタンパク質（ヘテロ三量体のＧＴＰアーゼ）と相互作用して細胞内の二次的メッセンジャー、例えば、サイクリックＡＭＰ、イノシトールリン酸

、ジアシルグリセロール及びカルシウムイオンの合成を調節するという意味において、共通のシグナル伝達機構とを共有する。ＧＰＣＲのファミリーＢ（セクレチン受容体ファミリー又は「ファミリー２」）は、ポリペプチドホルモン及び細胞膜における細胞間相互作用を媒介すると考えられる分子に対する受容体を含む小さいが構造的かつ機能的に多様なタンパク質群である（例えば、Harmar et al., Genome Biol. 2001;2(12):REVIEWS3013参照）。セクレチン受容体ファミリーのメンバーに関する構造生物学では、リガンドの結合を伴う又は伴わないそれらのＮ末端のいくつかの結晶構造の公開を含む重要な進歩があった。これらの業績はリガンドの結合についての理解を拡張しており、構造ベースのリガンドデザインに有用なプラットフォームを提供する（例えば、Poyner et al., Br J Pharmacol. 2012 May;166(1):1-3参照）。

【０１９３】

例えば、エキセンディン４リガンド又はこの誘導体（例えば、システインで置換されたエキセンディン４ターゲティングリガンド、例えば、配列番号２として提示されたターゲティングリガンド）を使用して膵細胞表面タンパク質ＧＬＰ１Ｒ（例えば、膵島β細胞をターゲティングする）をターゲティングするように、対象を送達する分子を使用することを所望してもよい。ＧＬＰ１Ｒは脳及び膵臓内に多く存在するため、ＧＬＰ１Ｒへの結合のターゲティングをもたらすターゲティングリガンドは、脳及び膵臓をターゲティングするのに使用されうる。したがって、ＧＬＰ１Ｒのターゲティングは、疾患（例えば、１つ以上の遺伝子編集ツールの送達を介する）、例えば、ハンチントン病（ＣＡＧリピート拡大突然変異）、パーキンソン病（ＬＲＲＫ２突然変異）、ＡＬＳ（ＳＯＤ１突然変異）及び他のＣＮＳ疾患の治療に焦点を絞った方法（例．治療法）を容易とする。ＧＬＰ１Ｒのターゲティングはまた、疾患、例えば、Ｉ型糖尿病、ＩＩ型糖尿病及び膵臓がんの治療（例えば、１つ以上の遺伝子編集ツールの送達を介する）のために、ペイロードを膵島β細胞に送達することに焦点を絞った方法（例．治療法）も容易とする。

【０１９４】

エキセンディン４の修飾形を使用してＧＬＰ１Ｒをターゲティングする場合、システイン置換及び／又は挿入のための（例えば核酸ペイロードとのコンジュゲーションのための）アミノ酸は、２つの結合クレフトを破壊しないように架橋された複合体が向かなければならない方向を予測するために、３Ｄ空間内で回転させることが可能なＰＤＢによる三次元レンダリングを使用して、ＨＧＥＧＴＦＴＳＤＬＳＫＱＭＥＥＥＡＶＲＬＦＩＥＷＬＫＮＧＧＰＳＳＧＡＰＰＰＳ（配列番号１）であるエキセンディン４のアミノ酸配列を、グルカゴン－ＧＣＧＲ（４ＥＲＳ）及びＧＬＰ１－ＧＬＰ１Ｒ－ＥＣＤ複合体（ＰＤＢ：３ＩＯＬ）の結晶構造とアライメントすることにより同定されうる。（ファミリーＢのＧＰＣＲをターゲティングする）ターゲティングリガンドの所望の架橋部位（例．システイン残基の置換／挿入のための部位）が、対応する受容体の２つの結合クレフトに対して十分に直交する場合、高アフィニティーの結合のほか、共時的な長期エンドソームリサイクリング経路への（例えば最適のペイロード放出のための）隔離が生じうる。配列番号１のアミノ酸位置１０、１１及び／又は１２におけるシステイン置換は、Ｇｓにバイアスのかかったシグナル伝達カスケードの二相性結合及び特異的誘発、βアレスチンの関与、並びに受容体のアクチン細胞骨格からの解離をもたらす。一部の場合、このターゲティングリガンドは、共時的なオーソステリック部位の関与を伴わないＧＰＣＲのＮ末端ドメインへの結合のみ（アフィニティー鎖である、エキセンディン４［３１～３９］の結合のみの場合と同様に）が関与するものではない機構である受容体媒介型エンドサイトーシスを介して、ナノ粒子の細胞内移行を誘発する。

【０１９５】

一部の場合、本発明のターゲティングリガンドは、エキセンディン４のアミノ酸配列（配列番号１）と８５％以上（例．９０％以上、９５％以上、９８％以上、９９％以上又は１００％）の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部のこのような場合には、ターゲティングリガンドは、配列番号１で示されたアミノ酸配列の、Ｌ１０、Ｓ１１及びＫ１２に対応する位置のうちの１つ又は複数における、システインの置換又は挿入を含む。一部の

場合、ターゲティングリガンドは、配列番号１で示されたアミノ酸配列のＳ１１に対応する位置におけるシステインの置換又は挿入を含む。一部の場合、本発明のターゲティングリガンドは、エキセンディン４のアミノ酸配列（配列番号１）を有するアミノ酸配列を含む。一部の場合、ターゲティングリガンドは（リンカーを伴うか又は伴わずに）アンカードメイン（例．カチオン性アンカードメイン）とコンジュゲートする。

【０１９６】

別の例として述べると、一部の場合、本発明のターゲティングリガンドは、受容体チロシンキナーゼ（ＲＴＫ）、例えば、線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）受容体（ＦＧＦＲ）に結合する。したがって一部の場合、ターゲティングリガンドはＦＧＦの断片である（すなわち、ＦＧＦのアミノ酸配列を含む）。一部の場合、ターゲティングリガンドは、オーソステリックの結合時に占有されるＲＴＫのセグメント（例えば実施例参照）に結合する。一部の場合、ターゲティングリガンドはＲＴＫのヘパリンアフィニティードメインに結合する。一部の場合、ターゲティングリガンドは、ＦＧＦ受容体へのターゲティングされた結合をもたらし、アミノ酸配列ＫＮＧＧＦＦＬＲＩＨＰＤＧＲＶＤＧＶＲＥＫＳ（配列番号４）と８５％以上の配列同一性（例．９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上又は１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。一部の場合、ターゲティングリガンドは、ＦＧＦ受容体へのターゲティングされた結合をもたらし、配列番号４で示されたアミノ酸配列を含む。

【０１９７】

一部の場合、ＲＴＫのオーソステリック部位を占有する小型のドメイン（例．５～４０アミノ酸長）は、天然の増殖因子リガンドに特有でありうる細胞増殖性であり、かつ、がん原性であるシグナル伝達カスケードの関与を伴わずにＲＴＫ（例．ＦＧＦＲ）の核内分取に関するエンドサイトーシス経路に関与するのに使用されうる。例えば、切断型ｂＦＧＦ（ｔｂＦＧＦ）ペプチド（３０～１１５アミノ酸）は、ｂＦＧＦ受容体結合性部位及びヘパリン結合性部位の一部を含有し、このペプチドは、細胞増殖を刺激せずに細胞表面上のＦＧＦＲに効果的に結合しうる。ｔｂＦＧＦの配列は、ＫＲＬＹＣＫＮＧＧＦＦＬＲＩＨＰＤＧＲＶＤＧＶＲＥＫＳＤＰＨＩＫＬＱＬＱＡＥＥＲＧＶＶＳＩＫＧＶＣＡＮＲＹＬＡＭＫＥＤＧＲＬＬＡＳＫＣＶＴＤＥＣＦＦＦＥＲＬＥＳＮＮＹＮＴＹ（配列番号１３）（例えば、Cai et al., Int J Pharm. 2011 Apr 15;408(1-2):173-82参照）である。

【０１９８】

一部の場合、ターゲティングリガンドは、ＦＧＦ受容体へのターゲティングされた結合をもたらし、アミノ酸配列ＨＦＫＤＰＫ（配列番号５）（例えば実施例参照）を含む。一部の場合、ターゲティングリガンドは、ＦＧＦ受容体へのターゲティングされた結合をもたらし、アミノ酸配列ＬＥＳＮＮＹＮＴ（配列番号６）（例えば実施例参照）を含む。

【０１９９】

一部の場合、本発明のターゲティングリガンドは細胞表面糖タンパク質に対する結合を提供する。一部の場合、ターゲティングリガンドは細胞間接着分子に対する結合を提供する。例えば一部の場合、ターゲティングリガンドは、細胞間接着因子として機能する細胞表面糖タンパク質であって造血幹細胞（例．骨髄）上に見出されるＣＤ３４に対する結合を提供する。一部の場合、ターゲティングリガンドは、セレクチン、例えば、E-セレクチン、L-セレクチン又はP-セレクチン（例．セレクチンの最初の４０アミノ酸の中に見出されるシグナルペプチド）の断片である。一部の場合、本発明のターゲティングリガンドは、セレクチン（例．E-セレクチン、L-セレクチン、P-セレクチン）のスシドメインを含む。

【０２００】

一部の場合、ターゲティングリガンドは、アミノ酸配列ＭＩＡＳＱＦＬＳＡＬＴＬＶＬＬＩＫＥＳＧＡ（配列番号７）と８５％以上の配列同一性（例．９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上又は１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。一部の場合、ターゲティングリガンドは配列番号７で示されたアミノ酸配列を含む。一部の場合、ターゲティングリガンドは、アミノ酸配列ＭＶＦＰ

ＷＲＣＥＧＴＹＷＧＳＲＮＩＬＫＬＷＶＷＴＬＬＣＣＤＦＬＩＨＨＧＴＨＣ（配列番号８）と８５％以上の配列同一性（例．９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上又は１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。一部の場合、ターゲティングリガンドは配列番号８で示されたアミノ酸配列を含む。一部の場合、ターゲティングリガンドは、アミノ酸配列ＭＩＦＰＷＫＣＱＳＴＱＲＤＬＷＮＩＦＫＬＷＧＷＴＭＬＣＣＤＦＬＡＨＨＧＴＤＣ（配列番号９）と８５％以上の配列同一性（例．９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上又は１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。一部の場合、ターゲティングリガンドは、配列番号９で示されたアミノ酸配列を含む。一部の場合、ターゲティングリガンドは、アミノ酸配列ＭＩＦＰＷＫＣＱＳＴＱＲＤＬＷＮＩＦＫＬＷＧＷＴＭＬＣＣ（配列番号１０）と８５％以上の配列同一性（例．９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上又は１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。一部の場合、ターゲティングリガンドは配列番号１０で示されたアミノ酸配列を含む。

【０２０１】

一部の場合、本発明のターゲティングリガンドとして使用されうるセレクチンの断片（例．セレクチンの最初の４０アミノ酸の中に見出されるシグナルペプチド）は、特異的に修飾されたシアロムチンへの強力な結合を達することが可能であり、例えば、細胞外ＣＤ３４のさまざまなシアリルＬｅｗｉｓ^{x}修飾／Ｏ－シアル化は、P-セレクチン、L-セレクチン及びE-セレクチンについて、骨髄、リンパ、脾臓及び扁桃コンパートメントに対する示差的なアフィニティーをもたらしうる。一部の場合、逆に、ターゲティングリガンドは、ＣＤ３４の細胞外部分でありうる。一部のこのような場合には、リガンドのシアル化の修飾がターゲティングリガンドを多様なセレクチンへと示差的にターゲティングするのに利用されうる。

【０２０２】

一部の場合、本発明のターゲティングリガンドは、E-セレクチンに対する結合を提供する。E-セレクチンは、腫瘍細胞の内皮細胞への接着を媒介することが可能で、E-セレクチンに対するリガンドは、がん転移において役割を果たしうる。例として述べると、P-セレクチン糖タンパク質１（ＰＳＧＬ－１）（例えば、ヒト好中球に由来する）は、E-セレクチン（例えば、内皮により発現される）に対する高効率のリガンドとして機能することが可能で、したがって、本発明のターゲティングリガンドは、一部の場合ＰＳＧＬ－１のアミノ酸配列（又はE-セレクチンに結合するこの断片）を含みうる。別の例として述べると、E-セレクチンリガンド１（ＥＳＬ－１）はE-セレクチンに結合することが可能で、したがって、本発明のターゲティングリガンドは一部の場合ＥＳＬ－１のアミノ酸配列（又はE-セレクチンに結合するこの断片）を含みうる。一部の場合、ＰＳＧＬ－１及び／又はＥＳＬ－１のアミノ酸配列（又はE-セレクチンに結合するこれらの断片）を伴うターゲティングリガンドは、E-セレクチンに結合するために１つ以上のシアリルＬｅｗｉｓ修飾を保有する。別の例として述べると、一部の場合、ＣＤ４４、死受容体３（ＤＲ３）、ＬＡＭＰ１、ＬＡＭＰ２及びＭａｃ２－ＢＰは、E-セレクチンに結合することが可能で、したがって、本発明のターゲティングリガンドは、一部の場合ＣＤ４４、死受容体３（ＤＲ３）、ＬＡＭＰ１、ＬＡＭＰ２及びＭａｃ２－ＢＰのいずれか１つのアミノ酸配列（又はE-セレクチンに結合するこの断片）を含みうる。

【０２０３】

一部の場合、本発明のターゲティングリガンドは、P-セレクチンに対する結合を提供する。一部の場合、ＰＳＧＬ－１はこのようなターゲティングされた結合をもたらしうる。したがって一部の場合、本発明のターゲティングリガンドは、ＰＳＧＬ－１のアミノ酸配列（又はP-セレクチンに結合するこの断片）を含みうる。一部の場合、ＰＳＧＬ－１のアミノ酸配列（又はP-セレクチンに結合するこの断片）を伴うターゲティングリガンドは、P-セレクチンに結合するために１つ以上のシアリルＬｅｗｉｓ修飾を保有する。

【０２０４】

一部の場合、本発明のターゲティングリガンドは、ＣＤ３、ＣＤ８、ＣＤ４、ＣＤ２８、ＣＤ９０、ＣＤ４５ｆ、ＣＤ３４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ４７、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ；ＴＣＲα、ＴＣＲβ、ＴＣＲγ及び／又はＴＣＲδの定常領域；４－１ＢＢ、ＯＸ４０、ＯＸ４０Ｌ、ＣＤ６２Ｌ、ＡＲＰ５、ＣＣＲ５、ＣＣＲ７、ＣＣＲ１０、ＣＸＣＲ３、ＣＸＣＲ４、ＣＤ９４／ＮＫＧ２、ＮＫＧ２Ａ、ＮＫＧ２Ｂ、ＮＫＧ２Ｃ、ＮＫＧ２Ｅ、ＮＫＧ２Ｈ、ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫＧ２Ｆ、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ４６、ＮＫｐ３０、ＤＮＡＭ、ＸＣＲ１、ＸＣＬ１、ＸＣＬ２、ＩＬＴ、ＬＩＲ、Ｌｙ４９、ＩＬ２Ｒ、ＩＬ７Ｒ、ＩＬ１０Ｒ、ＩＬ１２Ｒ、ＩＬ１５Ｒ、ＩＬ１８Ｒ、ＴＮＦα、ＩＦＮγ、ＴＧＦ－β及びα５β１から選択される標的に対する結合を提供する。

【０２０５】

一部の場合、本発明のターゲティングリガンドはトランスフェリン受容体に対する結合を提供する。一部のこのような場合には、ターゲティングリガンドは、アミノ酸配列ＴＨＲＰＰＭＷＳＰＶＷＰ（配列番号１１）と８５％以上の配列同一性（例．９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上又は１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。一部の場合、ターゲティングリガンドは配列番号１１で示されたアミノ酸配列を含む。

【０２０６】

一部の場合、本発明のターゲティングリガンドは、インテグリン（例．α５β１インテグリン）に対する結合を提供する。一部のこのような場合、ターゲティングリガンドは、アミノ酸配列ＲＲＥＴＡＷＡ（配列番号１２）と８５％以上の配列同一性（例．９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上又は１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。一部の場合、ターゲティングリガンドは配列番号１２で示されたアミノ酸配列を含む。一部の場合、ターゲティングリガンドは、アミノ酸配列ＲＧＤＧＷ（配列番号１８１）と８５％以上の配列同一性（例．９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上又は１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。一部の場合、ターゲティングリガンドは配列番号１８１で示されたアミノ酸配列を含む。一部の場合、ターゲティングリガンドはアミノ酸配列である、ＲＧＤを含む。

【０２０７】

一部の場合、本発明のターゲティングリガンドは、インテグリンに対する結合を提供する。一部のこのような場合には、ターゲティングリガンドは、アミノ酸配列ＧＣＧＹＧＲＧＤＳＰＧ（配列番号１８２）と８５％以上の配列同一性（例．９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上又は１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。一部の場合、ターゲティングリガンドは配列番号１８２で示されたアミノ酸配列を含む。一部の場合、このようなターゲティングリガンドは、Ｎ末端がアセチル化されており及び／又はＣ末端がアミド（ＮＨ２）化されている。

【０２０８】

一部の場合、本発明のターゲティングリガンドは、インテグリン（例．α５β３インテグリン）に対する結合を提供する。一部のこのような場合には、ターゲティングリガンドは、アミノ酸配列ＤＧＡＲＹＣＲＧＤＣＦＤＧ（配列番号１８７）と８５％以上の配列同一性（例．９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上又は１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。一部の場合、ターゲティングリガンドは配列番号１８７で示されたアミノ酸配列を含む。

【０２０９】

一部の態様では、脳をターゲティングするのに使用されるターゲティングリガンドは、狂犬病ウイルス糖タンパク質（ＲＶＧ）に由来するアミノ酸配列（例．ＹＴＩＷＭＰＥＮＰＲＰＧＴＰＣＤＩＦＴＮＳＲＧＫＲＡＳＮＧＧＧＧ（配列番号１８３））を含む。一部のこのような場合には、ターゲティングリガンドは、配列番号１８３と８５％以上の配列同一性（例．９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５

％以上又は１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列で示されたアミノ酸配列を含む。ターゲティングリガンド（本明細書の別の箇所で説明する）のいずれについても同様に、ＲＶＧはアンカードメイン（例．９Ｒペプチド配列）とコンジュゲートし、及び／又は融合しうる。例えば、本発明のナノ粒子の表面コートの一部として使用される対象を送達する分子は、ＹＴＩＷＭＰＥＮＰＲＰＧＴＰＣＤＩＦＴＮＳＲＧＫＲＡＳＮＧＧＧＧＲＲＲＲＲＲＲＲＲ（配列番号１８０）を含みうる。

【０２１０】

一部の場合、本発明のターゲティングリガンドはｃ－Ｋｉｔ受容体に対する結合を提供する。一部のこのような場合には、ターゲティングリガンドは、配列番号１８４と８５％以上の配列同一性（例．９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上又は１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列で示されたアミノ酸配列を含む。一部の場合、ターゲティングリガンドは配列番号１８４で示されたアミノ酸配列を含む。

【０２１１】

一部の場合、本発明のターゲティングリガンドはＣＤ２７に対する結合を提供する。一部のこのような場合には、ターゲティングリガンドは、配列番号１８５と８５％以上の配列同一性（例．９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上又は１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列で示されたアミノ酸配列を含む。一部の場合、ターゲティングリガンドは配列番号１８５で示されたアミノ酸配列を含む。

【０２１２】

一部の場合、本発明のターゲティングリガンドはＣＤ１５０に対する結合を提供する。一部のこのような場合には、ターゲティングリガンドは、配列番号１８６と８５％以上の配列同一性（例．９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上、９９％以上、９９．５％以上又は１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列で示されたアミノ酸配列を含む。一部の場合、ターゲティングリガンドは配列番号１８６で示されたアミノ酸配列を含む。

【０２１３】

一部の態様では、ターゲティングリガンドは、ＫＬＳ　ＣＤ２７＋／ＩＬ－７Ｒａ－／ＣＤ１５０＋／ＣＤ３４－造血幹／前駆細胞（ＨＳＰＣ）に対する結合を提供する。例えば、遺伝子編集ツール（本明細書の別の箇所で説明する）は、ＢＣＬ１１ａ転写因子の発現を破壊し、この帰結として胎児ヘモグロビンを発生させるために導入されうる。別の例として述べると、β－グロビン（ＨＢＢ）遺伝子は、変更されたＥ７Ｖ置換を対応する相同性指向修復用のドナーＤＮＡ分子で補正するように直接ターゲティングされてもよい。１つの代表的な例として述べると、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導型ポリペプチド（例．Ｃａｓ９、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ、Ｃｐｆ１）は、それがＨＢＢ遺伝子内の座位に結合し、ゲノム内に二本鎖又は一本鎖切断を作製し、ゲノム修復を誘発するように適切なガイドＲＮＡと共に送達されうる。一部の場合、ドナーＤＮＡ分子（一本鎖又は二本鎖）が導入される（ペイロードの一部として）場合もあり、これが１４～３０日間放出される一方で、ガイドＲＮＡ／ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓタンパク質複合体（リボ核タンパク質複合体）は１～７日間放出されうる。

【０２１４】

一部の態様では、ターゲティングリガンドは、Ｔ細胞受容体を修飾するためにＣＤ４＋又はＣＤ８＋　Ｔ細胞、造血幹／前駆細胞（ＨＳＰＣ）又は末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）に対する結合を提供する。例えば、遺伝子編集ツール（本明細書の別の箇所で説明する）は、Ｔ細胞受容体を修飾するために導入されうる。Ｔ細胞受容体は、直接ターゲティングされ新規のＴ細胞受容体のための対応する相同性指向修復用のドナーＤＮＡ分子で置換されてもよい。１つの例として述べると、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ　ＲＮＡ誘導型ポリペプチド（例．Ｃａｓ９、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ、Ｃｐｆ１）は、それがＴＣＲ遺伝子内の座位に結合し、ゲノム内に二本鎖又は一本鎖切断を作製し、ゲノム修復を誘発するように適切な

ガイドＲＮＡと共に送達されうる。一部の場合、ドナーＤＮＡ分子（一本鎖又は二本鎖）が（ペイロードの一部として）導入される。本開示に従い、β-グロビン、ＣＣＲ５、Ｔ細胞受容体若しくは他の目的遺伝子をターゲティングする他のＣＲＩＳＰＲガイドＲＮＡ及びドナー配列、並びに／又は他の発現ベクターを使用してもよいことは当業者に明らかである。

【０２１５】

一部の態様では、ターゲティングリガンドは核酸アプタマーである。一部の態様では、ターゲティングリガンドはペプトイドである。

【０２１６】

また併せて、ターゲティングリガンドを構成する２つの異なるペプチド配列を伴う送達分子も提供される。例えば一部の場合、ターゲティングリガンドは二価（例．ヘテロ二価）である。一部の場合、細胞膜透過ペプチド及び／又はヘパリン硫酸プロテオグリカン結合性リガンドが、本発明のターゲティングリガンドのうちのいずれかと共にヘテロ二価のエンドサイトーシス誘因として使用される。ヘテロ二価のターゲティングリガンドは、ターゲティングリガンドのうちの１つに由来するアフィニティー配列と異なるターゲティングリガンドに由来するオーソステリック結合配列（例．所望のエンドサイトーシストラフィッキング経路に関与することが公知のオーソステリック結合配列）を含みうる。

【０２１７】

アンカードメイン

一部の態様では、送達分子は、アンカードメイン（例．カチオン性アンカードメイン、アニオン性アンカードメイン）へとコンジュゲートされたターゲティングリガンドを含む。一部の場合、本発明の送達媒体は、アンカードメインと共に凝縮され、及び／又はこれと静電相互作用するペイロードを含む（例えば、送達分子はペイロードを送達するのに使用される送達媒体でありうる）。一部の場合、ナノ粒子の表面コートは、アンカードメインを伴うこのような送達分子を含み、一部のこのような場合、ペイロードは、このようなナノ粒子のコア内にある（コアと相互作用する）。アンカードメインの詳細は上記帯電ポリマーであるポリペプチドドメインの項参照。

【０２１８】

ヒストンテールペプチド（ＨＴＰ）

一部の態様では、本発明のナノ粒子のカチオン性ポリペプチド組成物は、ヒストンペプチド又はヒストンペプチドの断片、例えば、Ｎ末端のヒストンテール（例えば、Ｈ１、Ｈ２（例．Ｈ２Ａ、Ｈ２ＡＸ、Ｈ２Ｂ）、Ｈ３又はＨ４ヒストンタンパク質のヒストンテール）を含む。本明細書では、ヒストンタンパク質のテール断片はヒストンテールペプチド（ＨＴＰ）という。このようなタンパク質（ヒストン及び／又はＨＴＰ）は、本発明のナノ粒子のコアの一部として核酸ペイロードと共に凝縮しうるため、本明細書では、１つ以上のヒストン又はＨＴＰ（例えば、カチオン性ポリペプチド組成物の一部として）を含むコアは、場合によってヌクレオソーム模倣体コアという。ヒストン及び／又はＨＴＰは単量体として組み入れられうるが、一部の場合、核酸ペイロードをナノ粒子のコアへと凝縮する場合に、二量体、三量体、四量体及び／又は八量体を形成しうる。一部の場合、ＨＴＰは、例えば、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ媒介型アセチル化の場合における多様なヒストン修飾により、脱プロトン化されうるだけでなく、また、コアの構成要素の効果的な核特異的アンパッキング（例．ペイロードの放出）も媒介しうる。ヒストン及び／又はＨＴＰを含むコアのトラフィッキングは、ゴルジ体及び小胞体を介する逆行輸送を利用する代替的なエンドサイトーシス経路に依拠してもよい。さらに、一部のヒストンは内因性の核局在化配列を含み、ＮＬＳのコアへの組入れは、コア（ペイロードを含む）を標的細胞の核へと方向付けうる。

【０２１９】

一部の態様では、本発明のカチオン性ポリペプチド組成物は、Ｈ２Ａ、Ｈ２ＡＸ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３又はＨ４タンパク質のアミノ酸配列を有するタンパク質を含む。一部の場合、本発明のカチオン性ポリペプチド組成物は、ヒストンタンパク質のＮ末端領域に対応するア

ミノ酸配列を有するタンパク質を含む。例えば、断片（ＨＴＰ）は、ヒストンタンパク質の最初の５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５又は５０のＮ末端アミノ酸を含みうる。一部の場合、ＨＴＰは、ヒストンタンパク質のＮ末端領域に由来する５～５０アミノ酸（例．５～４５、５～４０、５～３５、５～３０、５～２５、５～２０、８～５０、８～４５、８～４０、８～３５、８～３０、１０～５０、１０～４５、１０～４０、１０～３５又は１０～３０アミノ酸）を含む。一部の場合、本発明のカチオン性ポリペプチドは、５～１５０アミノ酸（例．５～１００、５～５０、５～３５、５～３０、５～２５、５～２０、８～１５０、８～１００、８～５０、８～４０、８～３５、８～３０、１０～１５０、１０～１００、１０～５０、１０～４０、１０～３５又は１０～３０アミノ酸）を含む。

【０２２０】

一部の場合、カチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチド（例えば、ヒストン又はＨＴＰ（例．Ｈ１、Ｈ２、Ｈ２Ａ、Ｈ２ＡＸ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３又はＨ４））は、翻訳後修飾（例えば一部の場合、１つ以上のヒスチジン、リシン、アルギニン、又は他の相補性残基における）を含む。例えば一部の場合、カチオン性ポリペプチドは、メチル化される（及び／又はメチル化／脱メチル化を受けやすい）か、アセチル化される（及び／又はアセチル化／脱アセチル化を受けやすい）か、クロトニル化される（及び／又はクロトニル化／脱クロトニル化を受けやすい）か、ユビキチニル化される（及び／又はユビキチン化／脱ユビキチン化を受けやすい）か、リン酸化される（及び／又はリン酸化／脱リン酸化を受けやすい）か、ＳＵＭＯ化される（及び／又はＳＵＭＯ化／脱ＳＵＭＯ化を受けやすい）か、ファルネシル化される（及び／又はファルネシル化／脱ファルネシル化を受けやすい）か、硫酸化される（及び／又は硫酸化／脱硫酸化を受けやすい）か、又は他の形で翻訳後修飾される。一部の場合、カチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチド（例えば、ヒストン又はＨＴＰ（例．Ｈ１、Ｈ２、Ｈ２Ａ、Ｈ２ＡＸ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３又はＨ４））は、ｐ３００／ＣＢＰの基質（例えば下記の代表的なＨＴＰ、例えば配列番号１２９～１３０参照）である。一部の場合、カチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチド（例えば、ヒストン又はＨＴＰ（例．Ｈ１、Ｈ２、Ｈ２Ａ、Ｈ２ＡＸ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３又はＨ４））は、硫酸化されるか、又は（例えばチオ硫酸スルフルトランスフェラーゼの基質として）硫酸化を受けやすい（例えばシステイン及び／又はメチオニン残基を含みうる）１つ以上のチオール残基を含む。一部の場合、カチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチド（例えば、ヒストン又はＨＴＰ（例．Ｈ１、Ｈ２、Ｈ２Ａ、Ｈ２ＡＸ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３又はＨ４））はＣ末端がアミド化される。ヒストンＨ２Ａ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３、及びＨ４（及び／又はＨＴＰ）は、転写活性を促進又は抑制し核特異的放出動態を変更するように、それらのリシンのいずれかが、モノメチル化されてもよく、ジメチル化されてもよく、又はトリメチル化されてもよい。

【０２２１】

カチオン性ポリペプチドは、所望の修飾により合成される場合もあり、in vitro反応により修飾される場合もある。代替的に、カチオン性ポリペプチド（例．ヒストン又はＨＴＰ）は細胞集団内で発現される場合があり、所望の修飾タンパク質は単離／精製されうる。一部の場合、本発明のナノ粒子のカチオン性ポリペプチド組成物は、メチル化ＨＴＰ、例えば、Ｈ３Ｋ４（Ｍｅ３）のＨＴＰ配列（配列番号７５又は８８で示されたアミノ酸配列を含む）を含む。一部の場合、カチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチド（例えば、ヒストン又はＨＴＰ（例．Ｈ１、Ｈ２、Ｈ２Ａ、Ｈ２ＡＸ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３又はＨ４））は、Ｃ末端のアミドを含む。

【０２２２】

ヒストン及びＨＴＰの例

例は、以下の配列：

Ｈ２Ａ

ＳＧＲＧＫＱＧＧＫＡＲＡＫＡＫＴＲＳＳＲ（配列番号６２）［１～２０］

ＳＧＲＧＫＱＧＧＫＡＲＡＫＡＫＴＲＳＳＲＡＧＬＱＦＰＶＧＲＶＨＲＬＬＲＫＧＧＧ

（配列番号６３）［１～３９］
ＭＳＧＲＧＫＱＧＧＫＡＲＡＫＡＫＴＲＳＳＲＡＧＬＱＦＰＶＧＲＶＨＲＬＬＲＫＧＮＹＡＥＲＶＧＡＧＡＰＶＹＬＡＡＶＬＥＹＬＴＡＥＩＬＥＬＡＧＮＡＡＲＤＮＫＫＴＲＩＩＰＲＨＬＱＬＡＩＲＮＤＥＥＬＮＫＬＬＧＫＶＴＩＡＱＧＧＶＬＰＮＩＱＡＶＬＬＰＫＫＴＥＳＨＨＫＡＫＧＫ（配列番号６４）［１～１３０］

H２AX

ＣＫＡＴＱＡＳＱＥＹ（配列番号６５）［１３４～１４３］
ＫＫＴＳＡＴＶＧＰＫＡＰＳＧＧＫＫＡＴＱＡＳＱＥＹ（配列番号６６）［ＫＫ　１２０～１２９］
ＭＳＧＲＧＫＴＧＧＫＡＲＡＫＡＫＳＲＳＳＲＡＧＬＱＦＰＶＧＲＶＨＲＬＬＲＫＧＨＹＡＥＲＶＧＡＧＡＰＶＹＬＡＡＶＬＥＹＬＴＡＥＩＬＥＬＡＧＮＡＡＲＤＮＫＫＴＲＩＩＰＲＨＬＱＬＡＩＲＮＤＥＥＬＮＫＬＬＧＧＶＴＩＡＱＧＧＶＬＰＮＩＱＡＶＬＬＰＫＫＴＳＡＴＶＧＰＫＡＰＳＧＧＫＫＡＴＱＡＳＱＥＹ（配列番号６７）［１～１４３］

H２B

ＰＥＰＡ－Ｋ（ｃｒ）－ＳＡＰＡＰＫ（配列番号６８）［１～１１　Ｈ２ＢＫ５（ｃｒ）］
［ｃｒ：クロトニル化］
ＰＥＰＡＫＳＡＰＡＰＫ（配列番号６９）［１～１１］
ＡＱＫＫＤＧＫＫＲＫＲＳＲＫＥ（配列番号７０）［２１～３５］
ＭＰＥＰＡＫＳＡＰＡＰＫＫＧＳＫＫＡＶＴＫＡＱＫＫＤＧＫＫＲＫＲＳＲＫＥＳＹＳＩＹＶＹＫＶＬＫＱＶＨＰＤＴＧＩＳＳＫＡＭＧＩＭＮＳＦＶＮＤＩＦＥＲＩＡＧＥＡＳＲＬＡＨＹＮＫＲＳＴＩＴＳＲＥＩＱＴＡＶＲＬＬＬＰＧＥＬＡＫＨＡＶＳＥＧＴＫＡＶＴＫＹＴＳＳＫ（配列番号７１）［１～１２６］

【０２２３】

H３

ＡＲＴＫＱＴＡＲ（配列番号７２）［１～８］
ＡＲＴ－Ｋ（Ｍｅ１）－ＱＴＡＲＫＳ（配列番号７３）［１～８　Ｈ３Ｋ４（Ｍｅ１）］
ＡＲＴ－Ｋ（Ｍｅ２）－ＱＴＡＲＫＳ（配列番号７４）［１～８　Ｈ３Ｋ４（Ｍｅ２）］
ＡＲＴ－Ｋ（Ｍｅ３）－ＱＴＡＲＫＳ（配列番号７５）［１～８　Ｈ３Ｋ４（Ｍｅ３）］
ＡＲＴＫＱＴＡＲＫ－ｐＳ－ＴＧＧＫＡ（配列番号７６）［１～１５　Ｈ３ｐＳ１０］
ＡＲＴＫＱＴＡＲＫＳＴＧＧＫＡＰＲＫＷＣ－ＮＨ２（配列番号７７）［１～１８　ＷＣ、アミド］
ＡＲＴＫＱＴＡＲＫＳＴＧＧ－Ｋ（Ａｃ）－ＡＰＲＫＱ（配列番号７８）［１～１９　Ｈ３Ｋ１４（Ａｃ）］
ＡＲＴＫＱＴＡＲＫＳＴＧＧＫＡＰＲＫＱＬ（配列番号７９）［１～２０］
ＡＲＴＫＱＴＡＲ－Ｋ（Ａｃ）－ＳＴＧＧＫＡＰＲＫＱＬ（配列番号８０）［１～２０　Ｈ３Ｋ９（Ａｃ）］
ＡＲＴＫＱＴＡＲＫＳＴＧＧＫＡＰＲＫＱＬＡ（配列番号８１）［１～２１］
ＡＲＴＫＱＴＡＲ－Ｋ（Ａｃ）－ＳＴＧＧＫＡＰＲＫＱＬＡ（配列番号８２）［１～２１　Ｈ３Ｋ９（Ａｃ）］
ＡＲＴＫＱＴＡＲ－Ｋ（Ｍｅ２）－ＳＴＧＧＫＡＰＲＫＱＬＡ（配列番号８３）［１～２１　Ｈ３Ｋ９（Ｍｅ１）］
ＡＲＴＫＱＴＡＲ－Ｋ（Ｍｅ２）－ＳＴＧＧＫＡＰＲＫＱＬＡ（配列番号８４）［１～２１　Ｈ３Ｋ９（Ｍｅ２）］
ＡＲＴＫＱＴＡＲ－Ｋ（Ｍｅ２）－ＳＴＧＧＫＡＰＲＫＱＬＡ（配列番号８５）［１～２１　Ｈ３Ｋ９（Ｍｅ３）］
ＡＲＴ－Ｋ（Ｍｅ１）－ＱＴＡＲＫＳＴＧＧＫＡＰＲＫＱＬＡ（配列番号８６）［１～

２１　Ｈ３Ｋ４（Ｍｅ１）］
ＡＲＴ－Ｋ（Ｍｅ２）－ＱＴＡＲＫＳＴＧＧＫＡＰＲＫＱＬＡ（配列番号８７）［１～２１　Ｈ３Ｋ４（Ｍｅ２）］
ＡＲＴ－Ｋ（Ｍｅ３）－ＱＴＡＲＫＳＴＧＧＫＡＰＲＫＱＬＡ（配列番号８８）［１～２１　Ｈ３Ｋ４（Ｍｅ３）］
ＡＲＴＫＱＴＡＲ－Ｋ（Ａｃ）－ｐＳ－ＴＧＧＫＡＰＲＫＱＬＡ（配列番号８９）［１～２１　Ｈ３Ｋ９（Ａｃ）、ｐＳ１０］
ＡＲＴ－Ｋ（Ｍｅ３）－ＱＴＡＲ－Ｋ（Ａｃ）－ｐＳ－ＴＧＧＫＡＰＲＫＱＬＡ（配列番号９０）［１～２１　Ｈ３Ｋ４（Ｍｅ３）、Ｋ９（Ａｃ）、ｐＳ１０］
ＡＲＴＫＱＴＡＲＫＳＴＧＧＫＡＰＲＫＱＬＡＣ（配列番号９１）［１～２１　Ｃｙｓ］
ＡＲＴＫＱＴＡＲ－Ｋ（Ａｃ）－ＳＴＧＧＫＡＰＲＫＱＬＡＴＫＡ（配列番号９２）［１～２４　Ｈ３Ｋ９（Ａｃ）］
ＡＲＴＫＱＴＡＲ－Ｋ（Ｍｅ３）－ＳＴＧＧＫＡＰＲＫＱＬＡＴＫＡ（配列番号９３）［１～２４　Ｈ３Ｋ９（Ｍｅ３）］
ＡＲＴＫＱＴＡＲＫＳＴＧＧＫＡＰＲＫＱＬＡＴＫＡＡ（配列番号９４）［１～２５］
ＡＲＴ－Ｋ（Ｍｅ３）－ＱＴＡＲＫＳＴＧＧＫＡＰＲＫＱＬＡＴＫＡＡ（配列番号９５）［１～２５　Ｈ３Ｋ４（Ｍｅ３）］
ＴＫＱＴＡＲ－Ｋ（Ｍｅ１）－ＳＴＧＧＫＡＰＲ（配列番号９６）［３～１７　Ｈ３Ｋ９（Ｍｅ１）］
ＴＫＱＴＡＲ－Ｋ（Ｍｅ２）－ＳＴＧＧＫＡＰＲ（配列番号９７）［３～１７　Ｈ３Ｋ９（Ｍｅ２）］
ＴＫＱＴＡＲ－Ｋ（Ｍｅ３）－ＳＴＧＧＫＡＰＲ（配列番号９８）［３～１７　Ｈ３Ｋ９（Ｍｅ３）］
ＫＳＴＧＧ－Ｋ（Ａｃ）－ＡＰＲＫＱ（配列番号９９）［９～１９　Ｈ３Ｋ１４（Ａｃ）］
ＱＴＡＲＫＳＴＧＧＫＡＰＲＫＱＬＡＳＫ（配列番号１００）［５～２３］
ＡＰＲＫＱＬＡＴＫＡＡＲＫＳＡＰＡＴＧＧＶＫＫＰＨ（配列番号１０１）［１５～３９］
ＡＴＫＡＡＲＫＳＡＰＡＴＧＧＶＫＫＰＨＲＹＲＰＧ（配列番号１０２）［２１～４４］
ＫＡＡＲＫＳＡＰＡ（配列番号１０３）［２３～３１］
ＫＡＡＲＫＳＡＰＡＴＧＧ（配列番号１０４）［２３～３４］
ＫＡＡＲＫＳＡＰＡＴＧＧＣ（配列番号１０５）［２３～３４　Ｃｙｓ］
ＫＡＡＲ－Ｋ（Ａｃ）－ＳＡＰＡＴＧＧ（配列番号１０６）［Ｈ３Ｋ２７（Ａｃ）］
ＫＡＡＲ－Ｋ（Ｍｅ１）－ＳＡＰＡＴＧＧ（配列番号１０７）［Ｈ３Ｋ２７（Ｍｅ１）］
ＫＡＡＲ－Ｋ（Ｍｅ２）－ＳＡＰＡＴＧＧ（配列番号１０８）［Ｈ３Ｋ２７（Ｍｅ２）］
ＫＡＡＲ－Ｋ（Ｍｅ３）－ＳＡＰＡＴＧＧ（配列番号１０９）［Ｈ３Ｋ２７（Ｍｅ３）］
ＡＴ－Ｋ（Ａｃ）－ＡＡＲＫＳＡＰＳＴＧＧＶＫＫＰＨＲＹＲＰＧ（配列番号１１０）［２１～４４　Ｈ３Ｋ２３（Ａｃ）］
ＡＴＫＡＡＲＫ－ｐＳ－ＡＰＡＴＧＧＶＫＫＰＨＲＹＲＰＧ（配列番号１１１）［２１～４４　ｐＳ２８］
ＡＲＴＫＱＴＡＲＫＳＴＧＧＫＡＰＲＫＱＬＡＴＫＡＡＲＫＳＡＰＡＴＧＧＶ（配列番号１１２）［１～３５］
ＳＴＧＧＶ－Ｋ（Ｍｅ１）－ＫＰＨＲＹ（配列番号１１３）［３１～４１　Ｈ３Ｋ３６（Ｍｅ１）］
ＳＴＧＧＶ－Ｋ（Ｍｅ２）－ＫＰＨＲＹ（配列番号１１４）［３１～４１　Ｈ３Ｋ３６

（Ｍｅ２）］
ＳＴＧＧＶ－Ｋ（Ｍｅ３）－ＫＰＨＲＹ（配列番号１１５）［３１～４１　Ｈ３Ｋ３６（Ｍｅ３）］
ＧＴＶＡＬＲＥＩＲＲＹＱ－Ｋ（Ａｃ）－ＳＴＥＬＬＩＲ（配列番号１１６）［４４～６３　Ｈ３Ｋ５６（Ａｃ）］
ＡＲＴＫＱＴＡＲＫＳＴＧＧＫＡＰＲＫＱＬＡＴＫＡＡＲＫＳＡＰＡＴＧＧＶＫＫＰＨＲＹＲＰＧＴＶＡＬＲＥ（配列番号１１７）［１～５０］
ＴＥＬＬＩＲＫＬＰＦＱＲＬＶＲＥＩＡＱＤＦ－Ｋ（Ｍｅ１）－ＴＤＬＲＦＱＳＡＡＩ（配列番号１１８）［Ｈ３Ｋ７９（Ｍｅ１）］
ＥＩＡＱＤＦＫＴＤＬＲ（配列番号１１９）［７３～８３］
ＥＩＡＱＤＦ－Ｋ（Ａｃ）－ＴＤＬＲ（配列番号１２０）［７３～８３　Ｈ３Ｋ７９（Ａｃ）］
ＥＩＡＱＤＦ－Ｋ（Ｍｅ３）－ＴＤＬＲ（配列番号１２１）［７３～８３　Ｈ３Ｋ７９（Ｍｅ３）］
ＲＬＶＲＥＩＡＱＤＦＫＴＤＬＲＦＱＳＳＡＶ（配列番号１２２）［６９～８９］
ＲＬＶＲＥＩＡＱＤＦＫ－（Ｍｅ１）－ＴＤＬＲＦＱＳＳＡＶ（配列番号１２３）［６９～８９　Ｈ３Ｋ７９（Ｍｅ１）、アミド］
ＲＬＶＲＥＩＡＱＤＦＫ－（Ｍｅ２）－ＴＤＬＲＦＱＳＳＡＶ（配列番号１２４）［６９～８９　Ｈ３Ｋ７９（Ｍｅ２）、アミド］
ＲＬＶＲＥＩＡＱＤＦＫ－（Ｍｅ３）－ＴＤＬＲＦＱＳＳＡＶ（配列番号１２５）［６９～８９　Ｈ３Ｋ７９（Ｍｅ３）、アミド］
ＫＲＶＴＩＭＰＫＤＩＱＬＡＲＲＩＲＧＥＲＡ（配列番号１２６）［１１６～１３６］
ＭＡＲＴＫＱＴＡＲＫＳＴＧＧＫＡＰＲＫＱＬＡＴＫＶＡＲＫＳＡＰＡＴＧＧＶＫＫＰＨＲＹＲＰＧＴＶＡＬＲＥＩＲＲＹＱＫＳＴＥＬＬＩＲＫＬＰＦＱＲＬＭＲＥＩＡＱＤＦＫＴＤＬＲＦＱＳＳＡＶＭＡＬＱＥＡＣＥＳＹＬＶＧＬＦＥＤＴＮＬＣＶＩＨＡＫＲＶＴＩＭＰＫＤＩＱＬＡＲＲＩＲＧＥＲＡ（配列番号１２７）［１～１３６］

【０２２４】

Ｈ４

ＳＧＲＧＫＧＧ（配列番号１２８）［１～７］
ＲＧＫＧＧＫＧＬＧＫＧＡ（配列番号１２９）［４～１２］
ＳＧＲＧＫＧＧＫＧＬＧＫＧＧＡＫＲＨＲＫＶ（配列番号１３０）［１～２１］
ＫＧＬＧＫＧＧＡＫＲＨＲＫＶＬＲＤＮＷＣ－ＮＨ２（配列番号１３１）［８～２５ＷＣ、アミド］
ＳＧＲＧ－Ｋ（Ａｃ）－ＧＧ－Ｋ（Ａｃ）－ＧＬＧ－Ｋ（Ａｃ）－ＧＧＡ－Ｋ（Ａｃ）－ＲＨＲＫＶＬＲＤＮＧＳＧＳＫ（配列番号１３２）［１～２５　Ｈ４Ｋ５，８，１２，１６（Ａｃ）］
ＳＧＲＧＫＧＧＫＧＬＧＫＧＧＡＫＲＨＲＫ－ＮＨ２（配列番号１３３）［１～２０Ｈ４　ＰＲＭＴ７（タンパク質アルギニンメチルトランスフェラーゼ７）基質、Ｍ１］
ＳＧＲＧ－Ｋ（Ａｃ）－ＧＧＫＧＬＧＫＧＧＡＫＲＨＲＫ（配列番号１３４）［１～２０　Ｈ４Ｋ５（Ａｃ）］
ＳＧＲＧＫＧＧ－Ｋ（Ａｃ）－ＧＬＧＫＧＧＡＫＲＨＲＫ（配列番号１３５）［１～２０　Ｈ４Ｋ８（Ａｃ）］
ＳＧＲＧＫＧＧＫＧＬＧ－Ｋ（Ａｃ）－ＧＧＡＫＲＨＲＫ（配列番号１３６）［１～２０　Ｈ４Ｋ１２（Ａｃ）］
ＳＧＲＧＫＧＧＫＧＬＧＫＧＧＡ－Ｋ（Ａｃ）－ＲＨＲＫ（配列番号１３７）［１～２０　Ｈ４Ｋ１６（Ａｃ）］
ＫＧＬＧＫＧＧＡＫＲＨＲＫＶＬＲＤＮＷＣ－ＮＨ２（配列番号１３８）［１～２５ＷＣ、アミド］
ＭＳＧＲＧＫＧＧＫＧＬＧＫＧＧＡＫＲＨＲＫＶＬＲＤＮＩＱＧＩＴＫＰＡＩＲＲＬＡＲＲＧＧＶＫＲＩＳＧＬＩＹＥＥＴＲＧＶＬＫＶＦＬＥＮＶＩＲＤＡＶＴＹＴＥＨＡＫＲＫ

ＴＶＴＡＭＤＶＶＹＡＬＫＲＱＧＲＴＬＹＧＦＧＧ（配列番号１３９）［１～１０３］
を含むが、これらに限定されない。
【０２２５】
このように、本発明のカチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチドは、配列番号６２～１３９のいずれかで示されたアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含みうる。一部の場合、本発明のカチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチドは、配列番号６２～１３９のいずれかで示されたアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例．８５％以上、９０％以上、９５％以上、９８％以上、９９％以上又は１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。一部の場合、本発明のカチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチドは、配列番号６２～１３９のいずれかで示されたアミノ酸配列と９０％以上の配列同一性（例．９５％以上、９８％以上、９９％以上又は１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。カチオン性ポリペプチドは、任意の好都合な修飾を含むことが可能で、多数のこのような想定された修飾、例えば、メチル化、アセチル化、クロトニル化、ユビキチニル化、リン酸化、ＳＵＭＯ化、ファルネシル化、硫酸化などについては、上述されている。
【０２２６】
一部の場合、カチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチドは、配列番号９４で示されたアミノ酸配列と８０％以上の配列同一性（例．８５％以上、９０％以上、９５％以上、９８％以上、９９％以上又は１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。一部の場合、カチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチドは、配列番号９４で示されたアミノ酸配列と９５％以上の配列同一性（例．９８％以上、９９％以上又は１００％の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む。一部の場合、カチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチドは、配列番号９４で示されたアミノ酸配列を含む。一部の場合、カチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチドは、ヒトヒストン３タンパク質の最初の２５アミノ酸を含み、リシン４においてトリメチル化された（例えば一部の場合、Ｃ末端がアミド化された）Ｈ３Ｋ４（Ｍｅ３）（配列番号９５）により表される配列を含む。
【０２２７】
一部の態様では、カチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチド（例えば、ヒストン又はＨＴＰ（例．Ｈ１、Ｈ２、Ｈ２Ａ、Ｈ２ＡＸ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３又はＨ４））は、カチオン性（又は一部の場合、アニオン性）アミノ酸ポリマー、リンカー、ＮＬＳ、及び／又は他のカチオン性ポリペプチドとのコンジュゲーション（例えば一部の場合、分枝状ヒストン構造を形成する）を促進しうるシステイン残基を含む。例えば、システイン残基はスルフヒドリル化学反応（例．ジスルフィド結合）及び／又はアミン反応性化学反応を介する架橋（コンジュゲーション）のために使用されうる。一部の場合、システイン残基は内部システイン残基である。一部の場合、システイン残基はＮ末端及び／又はＣ末端に位置する。一部の場合、カチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチド（例えば、ヒストン又はＨＴＰ（例．Ｈ１、Ｈ２、Ｈ２Ａ、Ｈ２ＡＸ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３又はＨ４））は、システイン残基を付加する突然変異（例．挿入又は置換）を含む。システインを含むＨＴＰの例は、
ＣＫＡＴＱＡＳＱＥＹ（配列番号１４０）－Ｈ２ＡＸから
ＡＲＴＫＱＴＡＲＫＳＴＧＧＫＡＰＲＫＱＬＡＣ（配列番号１４１）－Ｈ３から
ＡＲＴＫＱＴＡＲＫＳＴＧＧＫＡＰＲＫＷＣ（配列番号１４２）
ＫＡＡＲＫＳＡＰＡＴＧＧＣ（配列番号１４３）－Ｈ３から
ＫＧＬＧＫＧＧＡＫＲＨＲＫＶＬＲＤＮＷＣ（配列番号１４４）－Ｈ４から
ＭＡＲＴＫＱＴＡＲＫＳＴＧＧＫＡＰＲＫＱＬＡＴＫＶＡＲＫＳＡＰＡＴＧＧＶＫＫＰＨＲＹＲＰＧＴＶＡＬＲＥＩＲＲＹＱＫＳＴＥＬＬＩＲＫＬＰＦＱＲＬＭＲＥＩＡＱＤＦＫＴＤＬＲＦＱＳＳＡＶＭＡＬＱＥＡＣＥＳＹＬＶＧＬＦＥＤＴＮＬＣＶＩＨＡＫＲＶＴＩＭＰＫＤＩＱＬＡＲＲＩＲＧＥＲＡ（配列番号１４５）－Ｈ３から
を含むが、これらに限定されない。

【０２２８】
一部の態様では、カチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチド（例えば、ヒストン又はＨＴＰ（例．Ｈ１、Ｈ２、Ｈ２Ａ、Ｈ２ＡＸ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３又はＨ４））は、本発明のナノ粒子のコアのカチオン性（及び／又はアニオン性）アミノ酸ポリマーへとコンジュゲートされる。例として述べると、ヒストン又はＨＴＰは、例えば、ポリマーのリシンのピリジルジスルフィド基がヒストン又はＨＴＰのシステインへのジスルフィド結合で置換されたシステイン残基を介して、カチオン性アミノ酸ポリマー（例．ポリ（リシン）を含むカチオン性アミノ酸ポリマー）へとコンジュゲートされうる。
【０２２９】
修飾／分枝構造
一部の態様では、本発明のカチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチドは、直鎖構造を有する。一部の態様では、本発明のカチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチドは分枝構造を有する。
【０２３０】
例えば一部の場合、カチオン性ポリペプチド（例えばＨＴＰ（例．システイン残基を伴うＨＴＰ））は、（例えばそのＣ末端において）カチオン性ポリマー（例．ポリ（L-アルギニン）、ポリ（D-リシン）、ポリ（L-リシン）、ポリ（D-リシン））の末端にコンジュゲートし、これにより、拡張型直鎖状ポリペプチドを形成する。一部の場合、１つ以上（２つ以上、３つ以上など）のカチオン性ポリペプチド（例えばＨＴＰ（例．システイン残基を伴うＨＴＰ））は、（例えばそれらのＣ末端において）カチオン性ポリマー（例．ポリ（L-アルギニン）、ポリ（D-リシン）、ポリ（L-リシン）、ポリ（D-リシン））の末端にコンジュゲートし、これにより、拡張型直鎖状ポリペプチドを形成する。一部の場合、カチオン性ポリマーは分子量が４，５００～１５０，０００Ｄａである。
【０２３１】
別の例として述べると、一部の場合、１つ以上（２つ以上、３つ以上など）のカチオン性ポリペプチド（例えばＨＴＰ（例．システイン残基を伴うＨＴＰ））は、（例えばそれらのＣ末端において）カチオン性ポリマー（例．ポリ（L-アルギニン）、ポリ（D-リシン）、ポリ（L-リシン）、ポリ（D-リシン））の側鎖にコンジュゲートし、これにより、分枝構造（分枝状ポリペプチド）を形成する。ナノ粒子のコアの構成要素（例えば本発明のカチオン性ポリペプチド組成物の構成要素）による分枝構造の形成は、一部の場合、達成されうるコアの凝縮（例．核酸ペイロードの凝縮）の量を増大させうる。したがって一部の場合、分枝構造を形成する構成要素を使用することが所望される。多様な種類の分枝構造が、目的の分枝構造であり、生成されうる（例えば、本発明のカチオン性ポリペプチド、例えば、ＨＴＰ、例えば、システイン残基を伴うＨＴＰ；ペプトイド、ポリアミドなどを使用して）分枝構造の例は、ブラシポリマー、ウェブ（例えば、スパイダーウェブ）、グラフトポリマー、星形ポリマー、櫛形ポリマー、ポリマーネットワーク、デンドリマーなどを含むが、これらに限定されない。
【０２３２】
一部の場合、分枝構造は、２～３０のカチオン性ポリペプチド（例えばＨＴＰ）（例えば、２～２５、２～２０、２～１５、２～１０、２～５、４～３０、４～２５、４～２０、４～１５又は４～１０のカチオン性ポリペプチド）を含み、ここで、各カチオン性ポリペプチドは、分枝構造の他のカチオン性ポリペプチドと同じ場合もあり、異なる場合もある。一部の場合、カチオン性ポリマーの分子量は４，５００～１５０，０００Ｄａである。一部の場合、カチオン性ポリマー（例．ポリ（L-アルギニン）、ポリ（D-リシン）、ポリ（L-リシン）、ポリ（D-リシン））の側鎖のうちの５％以上（例．１０％以上、２０％以上、２５％以上、３０％以上、４０％以上又は５０％以上）は、本発明のカチオン性ポリペプチド（例えばＨＴＰ（例．システイン残基を伴うＨＴＰ））とコンジュゲートする。一部の場合、カチオン性ポリマー（例．ポリ（L-アルギニン）、ポリ（D-リシン）、ポリ（L-リシン）、ポリ（D-リシン））の側鎖のうちの５０％以下（例．４０％以下、３０％以下、２５％以下、２０％以下、１５％以下、１０％以下又は５％以下）は、本発明の

カチオン性ポリペプチド（例えばＨＴＰ（例．システイン残基を伴うＨＴＰ））とコンジュゲートする。したがって、ＨＴＰはカチオン性アミノ酸ポリマーのようなポリマーの骨格から分枝していることがある。

【０２３３】

一部の場合、分枝構造の形成は、構成要素、例えば、ペプトイド（ポリペプトイド）、ポリアミド、デンドリマーなどを使用して促進することができる。例えば一部の場合、ペプトイド（例．ポリペプトイド）は、例えば一部の場合、ナノ粒子のコアの凝縮を促進することが可能かウェブ（例．スパイダーウェブ）構造を生成するために、ナノ粒子のコアの構成要素として使用される。

【０２３４】

本明細書における天然又は修飾ポリペプチド配列のうちの１つ又は複数は、末端に又は間欠的に、アルギニン、リシン又はヒスチジン配列で修飾されてもよい。一態様では、各ポリペプチドは、ナノ粒子のコア内に等しいアミンモル濃度で組み入れられる。この態様では、各ポリペプチドのＣ末端は５Ｒ（５つのアルギニン）で修飾されうる。一部の態様では、各ポリペプチドのＣ末端は９Ｒ（９つのアルギニン）で修飾されうる。一部の態様では、各ポリペプチドのＮ末端は５Ｒ（５つのアルギニン）で修飾されうる。一部の態様では、各ポリペプチドのＮ末端は９Ｒ（９つのアルギニン）で修飾されうる。一部の場合、Ｈ２Ａ、Ｈ２Ｂ及び／又はＨ４のヒストン断片（例．ＨＴＰ）は、各々、ＦＫＦＬであるカテプシンＢタンパク質分解性切断ドメイン、又はＲＧＦＦＰであるカテプシンＤタンパク質分解性切断ドメインと直列に架橋される。一部の場合、Ｈ２Ａ、Ｈ２Ｂ及び／又はＨ４のヒストン断片（例．ＨＴＰ）は、５Ｒ（５つのアルギニン）、９Ｒ（９つのアルギニン）、５Ｋ（５つのリシン）、９Ｋ（９つのリシン）、５Ｈ（５つのヒスチジン）又は９Ｈ（９つのヒスチジン）のカチオン性スペーサードメインにより直列に架橋されうる。一部の場合、１つ以上のＨ２Ａ、Ｈ２Ｂ及び／又はＨ４のヒストン断片（例．ＨＴＰ）は、それらのＮ末端でプロタミンとジスルフィド架橋する。

【０２３５】

分枝状ヒストン構造をどのように生成するのかを例示するために、代表的な調製法が提示される。このような方法のうちの１つの例は、以下を含む：等モル比のヒストンＨ２ＡＸ［１３４～１４３］、ヒストンＨ３［１～２１のＣｙｓ］、ヒストンＨ３［２３～３４のＣｙｓ］、ヒストンＨ４［８～２５のＷＣ］、及びＳＶ４０ Ｔ－Ａｇ抗原由来ＮＬＳの共有結合的修飾は、１０％のピリジルジスルフィドで修飾されたポリ（L-リシン）［ＭＷ＝５４００、１８０００又は４５０００Ｄａ；ｎ＝３０、１００又は２５０］を伴う反応において実施することができる。典型的な反応では、７００μＭのＣｙｓ修飾ヒストン／ＮＬＳ（２０ｎｍｏｌ）の２９μＬ水溶液を０．２Ｍのリン酸緩衝液（ｐＨ８．０）５７μＬに添加することができる。次いで、第２に、１００μＭのピリジルジスルフィド保護ポリ（リシン）溶液１４μＬをヒストン溶液に添加し、ピリジルジスルフィド基対システイン残基の比を１：２として、最終容量を１００μＬとすることができる。この反応は、室温で３時間行うことができる。反応を４回繰り返すことができ、３４３ｎｍにおけるピリジン-2-チオンの吸光度を介してコンジュゲーションの程度を決定することができる。

【０２３６】

別の例として述べると、０：１、１：４、１：３、１：２、１：１、１：２、１：３、１：４又は１：０のモル比のヒストンＨ３［１～２１のＣｙｓ］ペプチド及びヒストンＨ３［２３～３４のＣｙｓ］ペプチドの共有結合的修飾を、１０％のピリジルジスルフィドで修飾されたポリ（L-リシン）又はポリ（L-アルギニン）［ＭＷ＝５４００、１８０００又は４５０００Ｄａ；ｎ＝３０、１００又は２５０］を伴う反応において実施することができる。典型的な反応では、７００μＭのＣｙｓ修飾ヒストン（２０ｎｍｏｌ）の２９μＬ水溶液を０．２Ｍのリン酸緩衝液（ｐＨ８．０）５７μＬに添加することができる。次いで、第２に、１００μＭのピリジルジスルフィド保護ポリ（リシン）溶液１４μＬをヒストン溶液に添加し、ピリジルジスルフィド基対システイン残基の比を１：２として、最

終容量を１００μＬとすることができる。この反応は、室温で３時間行うことができる。反応を４回繰り返すことができ、３４３ｎｍにおけるピリジン-2-チオンの吸光度を介して、コンジュゲーションの程度を決定することができる。

【０２３７】

一部の場合、アニオン性ポリマーはターゲティングリガンドへとコンジュゲートされる。

【０２３８】

核局在化配列（ＮＬＳ）

一部の態様では、カチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチド（例えば、ヒストン又はＨＴＰ（例．Ｈ１、Ｈ２、Ｈ２Ａ、Ｈ２ＡＸ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３又はＨ４））は、１つ以上（例．２つ以上、３つ以上又は４つ以上）の核局在化配列（ＮＬＳ）を含む（及び／又はこれとコンジュゲートする）。したがって一部の場合、本発明のナノ粒子のカチオン性ポリペプチド組成物はＮＬＳを含むペプチドを含む。一部の場合、本発明のナノ粒子のヒストンタンパク質（又はＨＴＰ）は、１つ以上（例．２つ以上、３つ以上）の天然の核局在化シグナル（ＮＬＳ）を含む。一部の場合、本発明のナノ粒子のヒストンタンパク質（又はＨＴＰ）は、ヒストンタンパク質に対して異種である１つ以上（例．２つ以上、３つ以上）のＮＬＳを含む（すなわち、天然ではヒストン／ＨＴＰの一部として生じないＮＬＳであり、例えばＮＬＳはヒトにより付加されうる）。一部の場合、ＨＴＰはＮ及び／又はＣ末端にＮＬＳを含む。

【０２３９】

一部の態様では、カチオン性ポリマー組成物のカチオン性アミノ酸ポリマー（例．ポリ（アルギニン）（ＰＲ）、ポリ（リシン）（ＰＫ）、ポリ（ヒスチジン）（ＰＨ）、ポリ（オルニチン）、ポリ（シトルリン）、ポリ（D-アルギニン）（ＰＤＲ）、ポリ（D-リシン）（ＰＤＫ）、ポリ（D-ヒスチジン）（ＰＤＨ）、ポリ（D-オルニチン）、ポリ（D-シトルリン）、ポリ（L-アルギニン）（ＰＬＲ）、ポリ（L-リシン）（ＰＬＫ）、ポリ（L-ヒスチジン）（ＰＬＨ）、ポリ（L-オルニチン）又はポリ（L-シトルリン））は、１つ以上（例．２つ以上、３つ以上又は４つ以上）のＮＬＳを含む（及び／又はこれとコンジュゲートする）。一部の場合、カチオン性アミノ酸ポリマーはＮ及び／又はＣ末端にＮＬＳを含む。一部の場合、カチオン性アミノ酸ポリマーは内部ＮＬＳを含む。

【０２４０】

一部の態様では、アニオン性ポリマー組成物のアニオン性アミノ酸ポリマー（例．ポリ（グルタミン酸）（ＰＥＡ）、ポリ（アスパラギン酸）（ＰＤＡ）、ポリ（D-グルタミン酸）（ＰＤＥＡ）、ポリ（D-アスパラギン酸）（ＰＤＤＡ）、ポリ（L-グルタミン酸）（ＰＬＥＡ）、又はポリ（L-アスパラギン酸）（ＰＬＤＡ））は、１つ以上（例．２つ以上、３つ以上又は４つ以上）のＮＬＳを含む（及び／又はこれとコンジュゲートする）。一部の場合、アニオン性アミノ酸ポリマーはＮ及び／又はＣ末端にＮＬＳを含む。一部の場合、アニオン性アミノ酸ポリマーは内部ＮＬＳを含む。

【０２４１】

任意の好都合なＮＬＳが使用されうる（例えば、ヒストン、ＨＴＰ、カチオン性アミノ酸ポリマー、アニオン性アミノ酸ポリマーなどへとコンジュゲートされうる）。例は、クラス１及びクラス２の「単節型ＮＬＳ」のほか、クラス３～５のＮＬＳ（例えば、Kosugi et al., J Biol Chem. 2009 Jan 2;284(1):478-85から転載した図７参照）を含むが、これらに限定されない。一部の場合、ＮＬＳは式：（Ｋ／Ｒ）（Ｋ／Ｒ）X_{10-12}（Ｋ／Ｒ）$_{3-5}$を有する。一部の場合、ＮＬＳは式：Ｋ（Ｋ／Ｒ）Ｘ（Ｋ／Ｒ）を有する。

【０２４２】

一部の態様では、カチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチドは、１つ以上（例．２つ以上、３つ以上又は４つ以上）のＮＬＳを含む。一部の場合、カチオン性ポリペプチドはヒストンタンパク質又はヒストン断片（例．ＨＴＰ）ではない。したがって一部の場合、カチオン性ポリペプチド組成物のカチオン性ポリペプチドはＮＬＳ含有ペプチドである。

【０２４３】
一部の場合、ＮＬＳ含有ペプチドは、カチオン性（又は一部の場合アニオン性）アミノ酸ポリマー、リンカー、ＨＴＰの場合のヒストンタンパク質、及び／又は他のカチオン性ポリペプチド（例えば一部の場合、分枝状ヒストン構造の一部としての）とのコンジュゲーションを促進するシステイン残基を含む。例えば、システイン残基は、スルフヒドリル化学反応（例．ジスルフィド結合）及び／又はアミン反応性化学反応を介する架橋（コンジュゲーション）のために使用されうる。一部の場合、システイン残基は内部に存在する。一部の場合、システイン残基はＮ末端及び／又はＣ末端に位置する。一部の場合、カチオン性ポリペプチド組成物のＮＬＳ含有ペプチドは、システイン残基を付加する突然変異（例．挿入又は置換）（例えば野生型アミノ酸配列と比べた）を含む。

【０２４４】
ＮＬＳ含有ペプチド（又は任意の好都合なカチオン性ポリペプチド、例えば、ＨＴＰ又はカチオン性ポリマー又はカチオン性アミノ酸ポリマー又はアニオン性アミノ酸ポリマーへとコンジュゲートされたＮＬＳ）として使用されうるＮＬＳの例は、
ＰＫＫＫＲＫＶ（配列番号１５１）（Ｔ－ａｇ ＮＬＳ）
ＰＫＫＫＲＫＶＥＤＰＹＣ（配列番号１５２）－ＳＶ４０ Ｔ－Ａｇ由来ＮＬＳ
ＰＫＫＫＲＫＶＧＰＫＫＫＲＫＶＧＰＫＫＫＲＫＶＧＰＫＫＫＲＫＶＧＣ（配列番号１５３）（ＮＬＳ ＳＶ４０）
ＣＹＧＲＫＫＲＲＱＲＲＲ（配列番号１５４）－システインＴＡＴのＮ末端システイン
ＣＳＩＰＰＥＶＫＦＮＫＰＦＶＹＬＩ（配列番号１５５）
ＤＲＱＩＫＩＷＦＱＮＲＲＭＫＷＫＫ（配列番号１５６）
ＰＫＫＫＲＫＶＥＤＰＹＣ（配列番号１５７）－ＳＶ４０ Ｔ－Ａｇ由来ＮＬＳのＣ末端システイン
ＰＡＡＫＲＶＫＬＤ（配列番号１５８）［ｃＭｙｃ ＮＬＳ］
を含むが、これらに限定されない（これらの一部がシステイン残基を含む）。

【０２４５】
使用されうるＮＬＳの非限定的な例については、例えば、Kosugi et al., J Biol Chem. 2009 Jan 2;284(1):478-85、本明細書の図７を参照。

【０２４６】
ミトコンドリア局在化シグナル
一部の態様では、本発明のナノ粒子のカチオン性ポリペプチド（例えば、ヒストン又はＨＴＰ（例．Ｈ１、Ｈ２、Ｈ２Ａ、Ｈ２ＡＸ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３又はＨ４））、アニオン性ポリマー、及び／又はカチオン性ポリマーは、１つ以上（例．２つ以上、３つ以上又は４つ以上）のミトコンドリア局在化配列を含む（及び／又はこれとコンジュゲートする）。任意の好都合なミトコンドリア局在化配列が使用されうる。ミトコンドリア局在化配列の例は、ＰＥＤＥＩＷＬＰＥＰＥＳＶＤＶＰＡＫＰＩＳＴＳＳＭＭＭＰ（配列番号１４９）、ＳＤＨＢのミトコンドリア局在化配列、モノ／ジ／トリフェニルホスホニウム又は他のホスホニウム、ＶＡＭＰ １Ａ、ＶＡＭＰ １Ｂ、ＤＧＡＴ２のＮ末端の６７アミノ酸、及びＢａｘのＮ末端の２０アミノ酸を含むが、これらに限定されない。

【０２４７】
送達
上述したように、一部の態様では、本発明の方法は、ゲノムＤＮＡ内の２か所の各々において付着型切断を生成することを含む。一部の場合、付着型切断を生成するために、部位特異的ヌクレアーゼ（１つ以上の部位特異的ヌクレアーゼ）（又はこれをコードする核酸、例えば１つ以上の核酸）が標的細胞に導入される。標的細胞がin vivoにおいて存在する場合、これは、適切な構成要素（例えば１つ以上の送達媒体の一部としての）を個体へと投与することにより達せられうる。一部の場合、標的細胞は、部位特異的ヌクレアーゼをコードするＤＮＡを含み、本発明の方法の「生成する」工程は、部位特異的ヌクレアーゼの発現を誘導することを含む。

【０２４８】

したがって一部の場合、本発明の方法は、部位特異的ヌクレアーゼ（例．１つ以上の部位特異的ヌクレアーゼ）を（例えば、個体への投与を介して、トランスフェクションを介して、ナノ粒子を介して、送達分子を介するなどして）標的細胞に導入することを含む。一部の場合、このような方法は、１つ以上の部位特異的ヌクレアーゼをコードする核酸（例．ＲＮＡ又はＤＮＡ）を細胞に導入することを含む。同様に、一部の場合、本発明の方法は、直鎖状の二本鎖ドナーＤＮＡを（例えば、個体への投与を介して、トランスフェクションを介して、ナノ粒子を介して、送達分子を介するなどして）標的細胞に導入することを含む。一部の場合、ドナーＤＮＡ及び部位特異的ヌクレアーゼ（又はこれをコードする核酸）は、同じ送達媒体（例．ナノ粒子、送達分子など）の一部として細胞に導入される。構成要素（ドナーＤＮＡ、及び１つ以上の部位特異的ヌクレアーゼ（又はこれをコードする１つ以上の核酸））は、任意の所望の標的細胞、例えば真核細胞に送達されうる。

【０２４９】

一部の場合、標的細胞はin vitroであり（例えば細胞は培養物中にある）、例えば、細胞は確立された組織培養物細胞系の細胞でありうる。一部の場合、標的細胞はex vivoである（例えば、細胞は個体（例．患者）から単離された初代細胞（又は継代数の若い子孫細胞）である）。一部の場合、標的細胞はin vivoであり、したがって生物の内部にある（生物の一部である）。

【０２５０】

例えば、送達媒体のペイロードとしてのドナーＤＮＡ及び／又は１つ以上の部位特異的ヌクレアーゼ（又はこれをコードする１つ以上の核酸）は、以下の経路：全身、局所、非経口、皮下（s.c.）、静脈内（i.v.）、頭蓋内（i.c.）、脊髄内、眼内、皮内（i.d.）、筋内（i.m.）、リンパ内（i.l.）又は脊髄液内のうちのいずれかを介して、対象へと導入され（すなわち個体へと投与され）てもよい。構成要素は、注入（例．全身注入、直接的な局所注入、腫瘍及び／若しくは腫瘍切除部位又はこれらの近傍への局所注射など）、カテーテルなどにより導入されてもよい。局所送達（例．腫瘍及び／又はがんの部位への送達）のための方法の例は、例えば、シリンジによる、例えば、関節、腫瘍若しくは臓器、又は関節、腫瘍若しくは臓器の近傍への、例えばボーラス注入（injection）により；例えば対流を伴う、例えばカニューレ留置による、例えば連続注入（infusion）による送達を含む（例えば参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2007/0254842号参照）。

【０２５１】

対象への投与回数は変動してもよい。例えば、送達媒体のペイロードとしてのドナーＤＮＡ及び／又は１つ以上の部位特異的ヌクレアーゼ（又はこれをコードする１つ以上の核酸）の個体への導入は、１回のイベントであってもよいが；ある特定の状況では、このような治療は、限定的な期間改善を誘発し、反復的な治療のシリーズの続行を要求してもよい。他の状況では、効果が観察される前に、ドナーＤＮＡ及び／又は１つ以上の部位特異的ヌクレアーゼ（又はこれをコードする１つ以上の核酸）の複数回の投与が要求されてもよい。当業者に容易に理解されるように、正確なプロトコールは、疾患又は状態、病期及び治療される個体についてのパラメータに依存する。

【０２５２】

「治療有効量」又は「治療用量」とは、所望の治療結果（すなわち治療的効能を達成する）をもたらすのに十分な量である。治療有効量は１回以上の投与で投与されうる。ドナーＤＮＡ及び／又は１つ以上の部位特異的ヌクレアーゼ（又はこれをコードする１つ以上の核酸）の治療有効量は、個体に投与した場合に、本発明の目的でにおいて疾患状態／障害を緩和する、改善する、安定化させる、抑制する、防止する、進行を緩徐にする、又は遅らせるのに十分な量である。

【０２５３】

代表的な治療介入は、宿主ゲノムへと組み込まれた任意のレトロウイルスＤＮＡの除去に加えて、ＨＩＶ感染に対する抵抗性を作製する治療介入である。Ｔ細胞はＨＩＶの影響を直接に受けるので、ＣＤ３４＋／ＣＤ４５＋細胞に対するハイブリッドの血液ターゲテ

ィング戦略が探索されてもよい。例えば、効果的な治療介入は、ＨＳＣ及びＴ細胞を同時にターゲティングし、複数の誘導型ヌクレアーゼ（例えば単一の粒子内で）を介し、ＣＣＲ５－Δ３２及びｇａｇ／ｒｅｖ／ｐｏｌ遺伝子に対して除去を施す（及び置きかえ配列を送達する）ことを含みうる。

【０２５４】

一部の場合、標的細胞は、哺乳動物細胞（例．齧歯動物細胞、マウス細胞、ラット細胞、有蹄動物細胞、ウシ細胞、ヒツジ細胞、ブタ細胞、ウマ細胞、ラクダ細胞、ウサギ細胞、イヌ科動物（イヌ）細胞、ネコ科動物（ネコ）細胞、霊長動物細胞、非ヒト霊長動物細胞、ヒト細胞）である。任意の細胞がターゲティングされる場合があり、一部の場合、特定の細胞の特異的ターゲティングは、ターゲティングリガンド（例えば、ナノ粒子の表面コートの一部としての、送達分子の一部としての）の存在に依存し、この場合、ターゲティングリガンドは特定の細胞への結合のターゲティングをもたらす。例えば、ターゲティングされうる細胞は、骨髄細胞、造血幹細胞（ＨＳＣ）、長期ＨＳＣ、短期ＨＳＣ、造血幹／前駆細胞（ＨＳＰＣ）、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）、骨髄系前駆細胞、リンパ系前駆細胞、Ｔ細胞、Ｂ細胞（例えば、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２のターゲティングを介する）、ＮＫＴ細胞、ＮＫ細胞、樹状細胞、単球、顆粒球、赤血球、巨核細胞、マスト細胞、好塩基球、好酸球、好中球、マクロファージ（例えば、ＳＩＲＰα－模倣体ペプチドを介する、ＣＤ４７のターゲティングを介する）、赤血球系前駆細胞（例．ＨＵＤＥＰ細胞）、巨核細胞－赤血球系前駆細胞（ＭＥＰ）、骨髄系共通前駆細胞（ＣＭＰ）、複能性前駆細胞（ＭＰＰ）、造血幹細胞（ＨＳＣ）、短期ＨＳＣ（ＳＴ－ＨＳＣ）、ＩＴ－ＨＳＣ、長期ＨＳＣ（ＬＴ－ＨＳＣ）、内皮細胞、ニューロン、星状細胞、膵細胞、膵島β細胞、筋肉細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、肝細胞、脂肪細胞、腸細胞、結腸細胞及び胃細胞を含むが、これらに限定されない。

【０２５５】

多様な適用（例えば、ニューロン、膵臓細胞、造血幹細胞及び複能性前駆細胞などをターゲティングするための）の例については、例えばターゲティングリガンドの文脈において上述されている。例えば、造血幹細胞及び複能性前駆細胞は、in vivoにおける遺伝子編集（例えば挿入）のためにターゲティングされうる。in vivoにおける骨髄細胞のうちの１％（細胞約１５０億個）の編集であってもなお、ex vivo療法より多くの細胞（細胞約１００億個）をターゲティングすることになろう。別の例として述べると、膵臓細胞（例．膵島β細胞）は、例えば、膵臓がんを治療し、糖尿病などを治療するのにターゲティングされうる。別の例として述べると、脳内の体細胞、例えばニューロンがターゲティングされうる（例えば適応症、例えばハンチントン病、パーキンソン病（例．ＬＲＲＫ２突然変異）及びＡＬＳ（例．ＳＯＤ１突然変異）を治療するのに）。一部の場合、これは直接的な頭蓋内注入を介して達成されうる。

【０２５６】

別の例として述べると、内皮細胞及び造血系の細胞（例えば、巨核細胞及び／又は巨核細胞の祖型である、任意の前駆細胞、例えば、巨核細胞－赤血球系前駆細胞（ＭＥＰ）、骨髄系共通前駆細胞（ＣＭＰ）、複能性前駆細胞（ＭＰＰ）、造血幹細胞（ＨＳＣ）、短期ＨＳＣ（ＳＴ－ＨＳＣ）、ＩＴ－ＨＳＣ、長期ＨＳＣ（ＬＴ－ＨＳＣ）（例えば図８））は、フォンウィレブラント病を治療するのに本発明のナノ粒子（又は本発明のウイルス性又は非ウイルス性の送達媒体）によりターゲティングされうる。例えば、フォンウィレブラント因子（ＶＷＦ）をコードする遺伝子内に突然変異を保有する細胞（例えば、内皮細胞、巨核細胞及び／又は巨核細胞の祖型である、任意の前駆細胞、例えば、ＭＥＰ、ＣＭＰ、ＭＰＰ、ＨＳＣ、例えば、ＳＴ－ＨＳＣ、ＩＴ－ＨＳＣ、及び／又はＬＴ－ＨＳＣ）は、例えば、置きかえ配列を導入する（例えばドナーＤＮＡの送達を介する）ことにより、突然変異を導入された遺伝子を編集する（かつこれを補正する）ために（in vitro、ex vivo、in vivoにおいて）ターゲティングされうる。上記の場合のうちの一部において（例えば、フォンウィレブラント病の治療に関する場合、ＶＷＦをコードする遺伝子内に突然変異を保有する細胞のターゲティングに関する場合に）、本発明のターゲティングリ

ガンドはE-セレクチンに対する結合を提供する。

【０２５７】

本発明の方法及び組成物は、ゲノム内の突然変異のような既知の突然変異に連関する任意の数の疾患を治療するのに使用することができる。例えば、本発明の方法及び組成物は、鎌状赤血球病、βサラセミア、ＨＩＶ、骨髄異形成症候群、ＪＡＫ２媒介性真性多血症、ＪＡＫ２媒介性原発性骨髄線維症、ＪＡＫ２媒介性白血病及びさまざまな血液障害の治療に使用することができる。また、他の例としては、本発明の方法及び組成物は、Ｂ細胞抗体の生成、免疫療法（例えば、チェックポイント遮断剤の送達）及び幹細胞の分化にも使用することができる。

【０２５８】

一部の態様では、ターゲティングリガンドは、ＫＬＳ ＣＤ２７＋／ＩＬ－７Ｒａ－／ＣＤ１５０＋／ＣＤ３４－造血幹／前駆細胞（ＨＳＰＣ）に対する結合を提供する。例えば、β－グロビン（ＨＢＢ）遺伝子は、変更されたＥ７Ｖ置換を適切なドナーＤＮＡ分子で補正するように直接ターゲティングされてもよい。１つの例として述べると、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ＲＮＡ誘導型ポリペプチド（例．Ｃａｓ９、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ、Ｃｐｆ１）は、それがＨＢＢ遺伝子内の座位に結合し、ゲノム内の２か所で付着末端型切断を作製し、導入されるドナーＤＮＡの挿入を誘発するように、適切なガイドＲＮＡと共に送達されうる。一部の場合、ドナーＤＮＡ分子（一本鎖又は二本鎖）が導入される（ペイロードの一部として）場合もあり、これが１４～３０日間放出される一方で、ガイドＲＮＡ／ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓタンパク質複合体（リボ核タンパク質複合体）は１～７日間放出されうる。

【０２５９】

一部の態様では、ターゲティングリガンドは、Ｔ細胞受容体を修飾するためにＣＤ４＋又はＣＤ８＋ Ｔ細胞、造血幹／前駆細胞（ＨＳＰＣ）又は末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）に対する結合を提供する。例えば、遺伝子編集ツール（本明細書の別の箇所で説明する）は、Ｔ細胞受容体を修飾するために導入されうる。Ｔ細胞受容体は直接ターゲティングされ、新規のＴ細胞受容体のための対応する相同性指向修復用のドナーＤＮＡ分子で置換されてもよい。１つの例として述べると、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ ＲＮＡ誘導型ポリペプチド（例．Ｃａｓ９、ＣａｓＸ、ＣａｓＹ、Ｃｐｆ１）は、それがＨＢＢ遺伝子内の座位に結合し、ゲノム内の２か所で付着末端型切断を作製し、導入されるドナーＤＮＡの挿入を誘発するように、適切なガイドＲＮＡと共に送達されうる。本開示に従い、β-グロビン、ＣＣＲ５、Ｔ細胞受容体若しくは他の目的遺伝子をターゲティングする他のＣＲＩＳＰＲガイドＲＮＡ及びドナー配列並びに／又は他の発現ベクターを使用してもよいことは当業者に明らかである。

【０２６０】

一部の場合、本発明の方法は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）をコードし、一部の場合、約１００のドメインと定常領域がＶ（Ｄ）Ｊ領域から約１００，０００塩基対以上隔てられた１，０００，０００もの塩基対を有する座位をターゲティングするのに使用される。一部の場合、ドナーＤＮＡの挿入は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）タンパク質をコードするヌクレオチド配列内で生じる。一部のこのような場合には、ドナーＤＮＡは、ＴＣＲタンパク質のＣＤＲ１、ＣＤＲ２又はＣＤＲ３領域のアミノ酸をコードする。例えば、Dash et al., Nature. 2017 Jul 6;547(7661):89-93. Epub 2017 Jun 21及びGlanville et al., Nature. 2017 Jul 6;547(7661):94-98. Epub 2017 Jun 21.参照。

【０２６１】

一部の場合、本発明の方法は、遺伝子をそれらがゲノム操作に対するフェイルセーフとしての特異的エンハンサーの制御下（これとの作動可能な連結下）に置かれるように挿入するのに使用される。挿入が失敗しても、後続の遺伝子をもたらすエンハンサーが破壊され、任意の可能なインデルが発現する可能性は低い。遺伝子の挿入が成功すれば、その末端に終止コドンを伴い、特にマルチパートの遺伝子、例えばＴＣＲ座位に有用な新たな遺伝子が挿入されうる。一部の場合、本発明の方法は、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）若しく

は他の構築物をＴ細胞に挿入するか、又は、Ｂ細胞に特異的抗体若しくは抗体代替物（例．ナノボディー、サメ抗体など）を作製するのに使用することができる。

【０２６２】

一部の場合、ドナーＤＮＡは、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードするヌクレオチド配列を含む。一部のこのような場合には、ドナーＤＮＡの挿入は、ＣＡＲをコードするヌクレオチド配列の内因性Ｔ細胞プロモーターへの作動可能な連結を結果としてもたらす（すなわち、ＣＡＲの発現は内因性プロモーターの制御下に置かれる）。一部の場合、ドナーＤＮＡは、プロモーターに作動可能に連結しキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードするヌクレオチド配列を含む（かつ、これにより、挿入されたＣＡＲはドナーＤＮＡ上に存在したプロモーターの制御下に置かれる）。

【０２６３】

一部の場合、ドナーＤＮＡは、膜に結合し細胞外に提示される細胞特異的ターゲティングリガンドをコードするヌクレオチド配列を含む。一部の場合、前記ドナーＤＮＡの挿入は、細胞特異的ターゲティングリガンドをコードするヌクレオチド配列の内因性プロモーターへの作動可能な連結を結果としてもたらす。一部の場合、ドナーＤＮＡは、膜に結合し細胞外に提示される細胞特異的ターゲティングリガンドをコードする配列に作動可能に連結するプロモーター（かつ、これにより、ドナーＤＮＡの挿入の後で、膜に結合したターゲティングリガンドの発現は、ドナーＤＮＡ上に存在したプロモーターの制御下に置かれる）を含む。

【０２６４】

一部の態様では、ドナーＤＮＡの挿入は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α又はδサブユニットをコードするヌクレオチド配列内で生じる。一部の場合、ドナーＤＮＡの挿入は、ＴＣＲβ又はγサブユニットをコードするヌクレオチド配列内で生じる。一部の場合、本発明の方法及び／又は組成物は２つのドナーＤＮＡを含む。一部のこのような場合には、１つのドナーＤＮＡの挿入はＴ細胞受容体（ＴＣＲ）α又はδサブユニットをコードするヌクレオチド配列内で生じ、他のドナーＤＮＡの挿入はＴ細胞受容体（ＴＣＲ）β又はγサブユニットをコードするヌクレオチド配列内で生じる。

【０２６５】

一部の態様では、ドナーＤＮＡの挿入は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α又はδサブユニットの定常領域をコードするヌクレオチド配列内で生じる。一部の場合、ドナーＤＮＡの挿入は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）β又はγサブユニットの定常領域をコードするヌクレオチド配列内で生じる。一部の場合、本発明の方法及び／又は組成物は２つのドナーＤＮＡを含む。一部のこのような場合には、１つのドナーＤＮＡの挿入はＴ細胞受容体（ＴＣＲ）α又はδサブユニットの定常領域をコードするヌクレオチド配列内で生じ、他のドナーＤＮＡの挿入はＴ細胞受容体（ＴＣＲ）β又はγサブユニットの定常領域をコードするヌクレオチド配列内で生じる。

【０２６６】

一部の態様では、ドナーＤＮＡの挿入は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α又はδサブユニットのプロモーターとして機能するヌクレオチド配列内で生じる。一部の場合、ドナーＤＮＡの挿入は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）β又はγサブユニットのプロモーターとして機能するヌクレオチド配列内で生じる。一部の場合、本発明の方法及び／又は組成物は２つのドナーＤＮＡを含む。一部のこのような場合には、１つのドナーＤＮＡの挿入はＴ細胞受容体（ＴＣＲ）α又はδサブユニットのプロモーターとして機能するヌクレオチド配列内で生じ、他のドナーＤＮＡの挿入はＴ細胞受容体（ＴＣＲ）β又はγサブユニットのプロモーターとして機能するヌクレオチド配列内で生じる。

【０２６７】

一部の態様では、ドナーＤＮＡの配列の挿入は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α又はγサブユニットをコードするヌクレオチド配列内で生じる。一部の場合、ドナーＤＮＡの配列の挿入は、ＴＣＲβ又はδサブユニットをコードするヌクレオチド配列内で生じる。一部の場合、本発明の方法及び／又は組成物は２つのドナーＤＮＡを含む。一部のこのような場

合には、ドナーＤＮＡの、１つの配列の挿入はＴ細胞受容体（ＴＣＲ）α又はγサブユニットをコードするヌクレオチド配列内で生じ、ドナーＤＮＡの他の配列はＴ細胞受容体（ＴＣＲ）β又はδサブユニットをコードするヌクレオチド配列内で生じる。

【０２６８】

一部の態様では、ドナーＤＮＡの配列の挿入は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α又はγサブユニットの定常領域をコードするヌクレオチド配列内で生じる。一部の場合、ドナーＤＮＡの配列の挿入は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）β又はδサブユニットの定常領域をコードするヌクレオチド配列内で生じる。一部の場合、本発明の方法及び／又は組成物は２つのドナーＤＮＡを含む。一部のこのような場合には、ドナーＤＮＡの１つの配列の挿入はＴ細胞受容体（ＴＣＲ）α又はγサブユニットの定常領域をコードするヌクレオチド配列内で生じ、ドナーＤＮＡの他の配列はＴ細胞受容体（ＴＣＲ）β又はδサブユニットの定常領域をコードするヌクレオチド配列内で生じる。

【０２６９】

一部の態様では、ドナーＤＮＡの配列の挿入は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α又はγサブユニットのプロモーターとして機能するヌクレオチド配列内で生じる。一部の場合、ドナーＤＮＡの配列の挿入は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）β又はδサブユニットのプロモーターとして機能するヌクレオチド配列内で生じる。一部の場合、本発明の方法及び／又は組成物は２つのドナーＤＮＡを含む。一部のこのような場合には、ドナーＤＮＡの１つの配列の挿入はＴ細胞受容体（ＴＣＲ）α又はγサブユニットのプロモーターとして機能するヌクレオチド配列内で生じ、ドナーＤＮＡの他の配列の挿入はＴ細胞受容体（ＴＣＲ）β又はδサブユニットのプロモーターとして機能するヌクレオチド配列内で生じる。

【０２７０】

一部の態様では、ドナーＤＮＡの挿入は、挿入されたドナーＤＮＡのＴ細胞受容体（ＴＣＲ）α、β、γ、又はδの内因性プロモーターとの作動可能な連結を結果としてもたらす。一部の場合、ドナーＤＮＡは、挿入の後で、タンパク質をコードする配列がドナーＤＮＡ内に存在するプロモーターへの作動可能な連結を維持する（依然としてこの制御下にあり続ける）ように、ＴＣＲα、β、γ又はδのプロモーターに作動可能に連結するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。一部の場合、前記ドナーＤＮＡの挿入は、挿入されたドナーＤＮＡ（例えば、タンパク質をコードするヌクレオチド配列、例えば、ＣＡＲ、ＴＣＲα、ＴＣＲβ、ＴＣＲγ、又はＴＣＲδの配列）の、ＣＤ３又はＣＤ２８プロモーターとの作動可能な連結を結果としてもたらす。一部の場合、ドナーＤＮＡは、プロモーター（例．Ｔ細胞特異的プロモーター）に作動可能に連結するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。一部の場合、ドナーＤＮＡの挿入は、挿入されたドナーＤＮＡの内因性プロモーター（例．幹細胞又は体細胞に特異的な内因性プロモーター）との作動可能な連結を結果としてもたらす。一部の場合、ドナーＤＮＡは、レポータータンパク質（例えば、遺伝子編集効率を評価するための、蛍光タンパク質、例えば、ＧＦＰ、ＲＦＰ、ＹＦＰ、ＣＦＰ、近赤外及び／又は遠赤色レポータータンパク質など）をコードするヌクレオチド配列を含む。一部の場合、ドナーＤＮＡは、イントロンを有さないタンパク質をコードするヌクレオチド配列（例．ＴＣＲタンパク質の全体又は一部分をコードするヌクレオチド配列）を含む。

【０２７１】

一部の場合、本発明の方法（及び／又は本発明の組成物）は、適用のための配列の挿入、例えば、蛍光レポーター（例．蛍光タンパク質、例えば、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）／赤色蛍光タンパク質（ＲＦＰ）／近赤外／遠赤色蛍光タンパク質など）の、例えば任意の目的タンパク質（例．膜貫通タンパク質）の、Ｃ及び／又はＮ末端への挿入のために使用されうる。

【０２７２】

一部の態様では、ヌクレオチドドナーＤＮＡの配列の細胞のゲノムへの挿入は、挿入された配列の内因性プロモーター（例えば、（ｉ）Ｔ細胞特異的プロモーター；（ｉｉ）ＣＤ３プロモーター；（ｉｉｉ）ＣＤ２８プロモーター；（ｉｖ）幹細胞特異的プロモータ

ー；（ｖ）体細胞特異的プロモーター；（ｖｉ）Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α、β、γ、又はδのプロモーター；（ｖ）Ｂ細胞特異的プロモーター；（ｖｉ）ＣＤ１９プロモーター；（ｖｉｉ）ＣＤ２０プロモーター；（ｖｉｉｉ）ＣＤ２２プロモーター；（ｉｘ）Ｂ２９プロモーター；及び（ｘ）Ｔ細胞又はＢ細胞のＶ（Ｄ）Ｊ特異的プロモーター）との作動可能な連結を結果としてもたらす。一部の場合、挿入されるインサートドナー組成物のヌクレオチド配列は、プロモーター（例えば、（ｉ）Ｔ細胞特異的プロモーター；（ｉｉ）ＣＤ３プロモーター；（ｉｉｉ）ＣＤ２８プロモーター；（ｉｖ）幹細胞特異的プロモーター；（ｖ）体細胞特異的プロモーター；（ｖｉ）Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α、β、γ、又はδのプロモーター；（ｖ）Ｂ細胞特異的プロモーター；（ｖｉ）ＣＤ１９プロモーター；（ｖｉｉ）ＣＤ２０プロモーター；（ｖｉｉｉ）ＣＤ２２プロモーター；（ｉｘ）Ｂ２９プロモーター；及び（ｘ）Ｔ細胞又はＢ細胞のＶ（Ｄ）Ｊ特異的プロモーター）に作動可能に連結するタンパク質をコードする配列を含む。

【０２７３】

一部の態様では、細胞のゲノムへと挿入されるヌクレオチド配列はタンパク質をコードする。任意の好都合なタンパク質（例えば、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）タンパク質；Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）タンパク質の、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、又はＣＤＲ３領域；キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）；膜に結合し細胞外に提示される細胞特異的ターゲティングリガンド；レポータータンパク質（例．蛍光タンパク質、例えば、ＧＦＰ、ＲＦＰ、ＣＦＰ、ＹＦＰ、及び遠赤色蛍光発光、近赤外蛍光発光する蛍光タンパク質など）を含むが、これらに限定されない）がコードされうる。一部の態様では、細胞のゲノムへと挿入されるヌクレオチド配列は、多価（例．ヘテロ多価）表面受容体（例えば一部の場合、Ｔ細胞が、標的細胞である場合）をコードする。任意の、好都合な、多価受容体が使用される場合があり、非限定的な例は、二特異性若しくは三特異性のＣＡＲ及び／若しくはＴＣＲ、又は免疫細胞上の他のアフィニティータグを含む。このような挿入は、ターゲティングされた細胞に受容体を発現させるであろう。一部の場合、多価性は個別の受容体を挿入することにより達成され、この場合、挿入された受容体は、ＯＲゲート（一方又は他方が、活性化を誘発する）又はＡＮＤゲート（受容体によるシグナル伝達は共刺激性であり、ホモバレントの結合は、細胞、例えば、ターゲティングされたＴ細胞を活性化させない／刺激しないであろう）として機能する。挿入されたＤＮＡによりコードされるタンパク質（例．ＣＡＲ、ＴＣＲ、多価表面受容体）は、それが、ＣＤ３、ＣＤ８、ＣＤ４、ＣＤ２８、ＣＤ９０、ＣＤ４５ｆ、ＣＤ３４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ４７、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ；ＴＣＲα、ＴＣＲβ、ＴＣＲγ、及び／又はＴＣＲδの定常領域；４－１ＢＢ、ＯＸ４０、ＯＸ４０Ｌ、ＣＤ６２Ｌ、ＡＲＰ５、ＣＣＲ５、ＣＣＲ７、ＣＣＲ１０、ＣＸＣＲ３、ＣＸＣＲ４、ＣＤ９４／ＮＫＧ２、ＮＫＧ２Ａ、ＮＫＧ２Ｂ、ＮＫＧ２Ｃ、ＮＫＧ２Ｅ、ＮＫＧ２Ｈ、ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫＧ２Ｆ、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ４６、ＮＫｐ３０、ＤＮＡＭ、ＸＣＲ１、ＸＣＬ１、ＸＣＬ２、ＩＬＴ、ＬＩＲ、Ｌｙ４９、ＩＬ２Ｒ、ＩＬ７Ｒ、ＩＬ１０Ｒ、ＩＬ１２Ｒ、ＩＬ１５Ｒ、ＩＬ１８Ｒ、ＴＮＦα、ＩＦＮγ、ＴＧＦ－β、及びα５β１から選択される１つ以上の標的に結合する（例えば、細胞（例．Ｔ細胞）をこれらへとターゲティングするように機能する）ように選択されうる。

【０２７４】

一部の場合、挿入されるヌクレオチド配列は、受容体によりターゲティングされる（受容体が結合する）標的が個体の疾患（例．がん／腫瘍）に特異的である受容体をコードする。一部の場合、挿入されるヌクレオチド配列は、ヘテロ多価受容体によりターゲティングされる標的の組合せが個体の疾患（例．がん／腫瘍）に特異的であるヘテロ多価受容体をコードする。１つの代表的な例として述べると、個体のがん（例えば、生検を介する、例えば、腫瘍）をシーケンシングして（核酸配列、プロテオミクス、メタボロミクスなど）、標的でありうる罹患細胞の抗原（例えば、個体の対照細胞と比べて、腫瘍により過剰発現されるか、又はこれに固有である抗原）を同定し、免疫細胞が個体の罹患細胞（例．腫瘍細胞）を特異的にターゲティングするように、これらの標的のうちの１つ又は複数（

例えば、これらの標的のうちの、２つ以上、３つ以上、５つ以上、１０以上、１５以上、又は約２０）に結合する受容体（例．ヘテロ多価受容体）をコードするヌクレオチド配列を、免疫細胞（例えば、ＣＡＲ又はＴＣＲを使用する、例えば、ＮＫ細胞、Ｂ細胞、Ｔ細胞）へと挿入することができる。このように、挿入されるヌクレオチド配列は診断応答的であり（患者のプロテオミクス、ゲノミクス、又はメタボロミクスに関するユニークな洞察を受け取った（例えば、シーケンシングなどを介して）後で、コードされる受容体（例．ヘテロ多価受容体）が、デザインされうるという意味で）、これにより、アビディティーが大きく、特異的な免疫系の応答を作り出すようにデザインされうる。このようにして、免疫細胞（例．ＮＫ細胞、Ｂ細胞、Ｔ細胞など）は、個体の固有の疾患（例．がん）に対して効果的であるようにデザインされた受容体（例．ＣＡＲ及び／又はＴＣＲ）タンパク質（例えば、ヘテロ多価形）を発現するようにゲノム編集されうる。一部の場合、診断応答医療の後では、自己免疫に罹患した組織に対する同様のアビディティーが調節的Ｔ細胞に与えられうる。

【０２７５】

一部の場合、細胞のゲノムへと挿入されるドナーＤＮＡのヌクレオチド配列は、イントロンを有さないタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。一部の場合、イントロンを有さないヌクレオチド配列は、ＴＣＲタンパク質の全体又は一部分をコードする。

【０２７６】

一部の態様では、１つを超える送達媒体が標的細胞に導入されうる。例えば一部の場合、本発明の方法は、前記送達媒体のうちの第１及び第２の送達媒体を細胞に導入することを含み、ここで、細胞のゲノムへと挿入される第１の送達媒体のヌクレオチドドナーＤＮＡの配列は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α又はδサブユニットをコードし、細胞のゲノムへと挿入される第２の送達媒体のヌクレオチドドナーＤＮＡの配列は、ＴＣＲβ又はγサブユニットをコードする。一部の場合、本発明の方法は、前記送達媒体のうちの第１及び第２の送達媒体を細胞に導入することを含み、ここで、細胞のゲノムへと挿入される第１の送達媒体のヌクレオチドドナーＤＮＡの配列は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α又はδサブユニットの定常領域をコードし、細胞のゲノムへと挿入される第２の送達媒体のヌクレオチドドナーＤＮＡの配列は、ＴＣＲβ又はγサブユニットの定常領域をコードする。

【０２７７】

一部の場合、本発明の方法は、前記送達媒体のうちの第１及び第２の送達媒体を細胞に導入することを含み、この場合、第１の送達媒体のヌクレオチドドナーＤＮＡの配列は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α又はδサブユニットのプロモーターとして機能するヌクレオチド配列内に挿入され、第２の送達媒体のヌクレオチドドナーＤＮＡの配列は、ＴＣＲβ又はγサブユニットのプロモーターとして機能するヌクレオチド配列内に挿入される。ＴＣＲタンパク質及びＣＤＲに関するさらなる情報については、例えば、Dash et al., Nature. 2017 Jul 6;547(7661):89-93. Epub 2017 Jun 21及びGlanville et al., Nature. 2017 Jul 6;547(7661):94-98. Epub 2017 Jun 21.を参照。

【０２７８】

一部の場合、本発明の方法は、前記送達媒体のうちの第１及び第２の送達媒体を細胞に導入することを含み、ここで、細胞のゲノムへと挿入される第１の送達媒体のヌクレオチドドナーＤＮＡの配列はＴ細胞受容体（ＴＣＲ）α又はγサブユニットをコードし、細胞のゲノムへと挿入される第２の送達媒体のヌクレオチドドナーＤＮＡの配列は、ＴＣＲβ又はδサブユニットをコードする。一部の場合、本発明の方法は、前記送達媒体のうちの第１及び第２の送達媒体を細胞に導入することを含み、ここで、細胞のゲノムに挿入される第１の送達媒体のヌクレオチドドナーＤＮＡの配列はＴ細胞受容体（ＴＣＲ）α又はδサブユニットの定常領域をコードし、細胞のゲノムに挿入される第２の送達媒体のヌクレオチドドナーＤＮＡの配列はＴＣＲβ又はγサブユニットの定常領域をコードする。一部の場合、本発明の方法は、前記送達媒体のうちの第１及び第２の送達媒体を細胞に導入することを含み、この場合、第１の送達媒体のヌクレオチドドナーＤＮＡの配列は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α又はγサブユニットのプロモーターとして機能するヌクレオチド配列

内に挿入され、第２の送達媒体のヌクレオチドドナーＤＮＡの配列は、ＴＣＲβ又はδサブユニットのプロモーターとして機能するヌクレオチド配列内に挿入される。ＴＣＲタンパク質及びＣＤＲに関する、さらなる情報については、例えば、Dash et al., Nature. 2017 Jul 6;547(7661):89-93. Epub 2017 Jun 21及びGlanville et al., Nature. 2017 Jul 6;547(7661):94-98. Epub 2017 Jun 21.を参照。

【０２７９】

共送達（本発明のナノ粒子には限定されない）

上述したように、複数のペイロードを同じパッケージ（送達媒体）の一部として送達することの１つの利点は、各ペイロードの効率が低下しないことである。一部の態様では、ドナーＤＮＡ及び１つ以上の部位特異的ヌクレアーゼ（又はこれをコードする１つ以上の核酸）は、同じ送達媒体のペイロードである。一部の態様では、ドナーＤＮＡ及び／又は１つ以上の遺伝子編集ツール（例えば本明細書の別の箇所で説明する）は、タンパク質（及び／又はこれをコードするＤＮＡ若しくはｍＲＮＡ）及び／又はゲノム編集効率を増大させる非コードＲＮＡと組み合わせて送達される。（例えば同じパッケージ／送達媒体の一部として送達される場合がある。送達媒体は本発明のナノ粒子である必要はない。）一部の態様では、１つ以上の遺伝子編集ツールは、タンパク質（及び／又はこれをコードするＤＮＡ若しくはｍＲＮＡ）並びに／又は細胞の分裂及び／若しくは分化を制御する非コードＲＮＡと組み合わせて送達される。（例えば同じパッケージ／送達媒体の一部として送達される場合がある。送達媒体は本発明のナノ粒子である必要はない。）例えば一部の場合、１つ以上の遺伝子編集ツールは、タンパク質（及び／又はこれをコードするＤＮＡ若しくはｍＲＮＡ）及び／又は細胞分裂を制御する非コードＲＮＡと組み合わせて送達される。（例えば同じパッケージ／送達媒体の一部として送達される場合がある。送達媒体は本発明のナノ粒子である必要はない。）一部の場合、１つ以上の遺伝子編集ツールは、タンパク質（及び／又はこれをコードするＤＮＡ若しくはｍＲＮＡ）及び／又は分化を制御する非コードＲＮＡと組み合わせて送達される。（例えば同じパッケージ／送達媒体の一部として送達される場合がある。送達媒体は本発明のナノ粒子である必要はない。）一部の場合、１つ以上の遺伝子編集ツールは、タンパク質（及び／又はこれをコードするＤＮＡ若しくはｍＲＮＡ）及び／又は細胞ＤＮＡ修復機構にバイアスをかける非コードＲＮＡと組み合わせて送達される。（例えば同じパッケージ／送達媒体の一部として送達される場合がある。送達媒体は本発明のナノ粒子である必要はない。）

【０２８０】

上述したように、一部の場合、送達媒体は本発明のナノ粒子である必要がない。例えば一部の場合、送達媒体はウイルス性であり、一部の場合、送達媒体は非ウイルス性である。非ウイルス性送達システムの例は、複数の核酸ペイロード又はタンパク質と核酸のペイロードの組合せを共凝縮させるのに使用されうる材料を含む。例は、（１）脂質ベースの粒子、例えば、両性イオン又はカチオン性脂質及びエクソソーム又はエクソソーム由来の小胞；（２）無機／ハイブリッドの複合粒子、例えば、核酸及び／又はタンパク質のペイロードと共に共凝縮されたイオン性複合体、並びにＣａ、Ｍｇ、Ｓｉ、Ｆｅのカチオン性イオン性状態、及び生理学的アニオン、例えば、O^{2-}、ＯＨ、PO_4^{3-}、SO_4^{2-}から凝縮されうる複合体を含む無機／ハイブリッドの複合粒子；（３）炭水化物送達媒体、例えば、シクロデキストリン及び／又はアルギネート；（４）ポリマー性及び／又は共ポリマー性の複合体、例えば、ポリ（アミノ酸）ベースの静電複合体、ポリ（アミド－アミン）、及びカチオン性ポリ（Ｂ－アミノエステル）；並びに（５）ウイルス様粒子（例えば、タンパク質及び核酸ベースの）を含むが、これらに限定されない。ウイルス性送達システムの例は、ＡＡＶ、アデノウイルス性、レトロウイルス性及びレンチウイルス性送達システムを含むが、これらに限定されない。

【０２８１】

共送達のためのペイロードの例

一部の態様では、ドナーＤＮＡ及び／又は１つ以上の遺伝子編集ツールは、ＳＣＦ（及び／又はＳＣＦをコードするＤＮＡ若しくはｍＲＮＡ）、ＨｏｘＢ４（及び／又はＨｏｘ

Ｂ４をコードするＤＮＡ若しくはｍＲＮＡ）、ＢＣＬ－ＸＬ（及び／又はＢＣＬ－ＸＬをコードするＤＮＡ若しくはｍＲＮＡ）、ＳＩＲＴ６（及び／又はＳＩＲＴ６をコードするＤＮＡ若しくはｍＲＮＡ）、ｍｉＲ－１５５を抑制する核酸分子（例．ｓｉＲＮＡ及び／又はＬＮＡ）、ｋｕ７０の発現を低減する核酸分子（例．ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、マイクロＲＮＡ）、及びｋｕ８０の発現を低減する核酸分子（例．ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、マイクロＲＮＡ）のうちの１つ又は複数と組み合わせて送達されうる。（例えば、同じパッケージ／送達媒体の一部として送達される場合がある。送達媒体は本発明のナノ粒子である必要はない。）

【０２８２】

一体に送達されうるマイクロＲＮＡ（ＲＮＡとして、又はＲＮＡをコードするＤＮＡとして送達される）の例については、図９Ａ参照。例えば、以下のマイクロＲＮＡは、以下の目的で使用されうる：多能性幹細胞の外胚葉系統への分化を遮断する目的で：ｍｉＲ－４３０／４２７／３０２；多能性幹細胞の内胚葉系統への分化を遮断する目的で：ｍｉＲ－１０９及び／又はｍｉＲ－２４；多能性幹細胞の内胚葉系統への分化を駆動する目的で：ｍｉＲ－１２２及び／又はｍｉＲ－１９２；外胚葉前駆細胞の角化細胞への分化を駆動する目的で：ｍｉＲ－２０３；神経堤幹細胞の平滑筋への分化を駆動する目的で：ｍｉＲ－１４５；神経幹細胞、グリア細胞及び／又はニューロンへの分化を駆動する目的で：ｍｉＲ－９及び／又はｍｉＲ－１２４ａ；中胚葉前駆細胞の軟骨細胞への分化を遮断する目的で：ｍｉＲ－１９９ａ；中胚葉前駆細胞の骨芽細胞への分化を駆動する目的で：ｍｉＲ－２９６及び／又はｍｉＲ－２８６１；中胚葉前駆細胞の心筋への分化を駆動する目的で：ｍｉＲ－１；中胚葉前駆細胞の心筋への分化を遮断する目的で：ｍｉＲ－１３３；中胚葉前駆細胞の骨格筋への分化を駆動する目的で：ｍｉＲ－２１４、ｍｉＲ－２０６、ｍｉＲ－１及び／又はｍｉＲ－２６ａ；中胚葉前駆細胞の骨格筋への分化を遮断する目的で：ｍｉＲ－１３３、ｍｉＲ－２２１及び／又はｍｉＲ－２２２；造血前駆細胞の分化への分化を駆動する目的で：ｍｉＲ－２２３；造血前駆細胞の分化への分化を遮断する目的で：ｍｉＲ－１２８ａ及び／又はｍｉＲ－１８１ａ；造血前駆細胞のリンパ系前駆細胞への分化を駆動する目的で：ｍｉＲ－１８１；造血前駆細胞のリンパ系前駆細胞への分化を遮断する目的で：ｍｉＲ－１４６；造血前駆細胞の骨髄系前駆細胞への分化を遮断する目的で：ｍｉＲ－１５５、ｍｉＲ－２４ａ及び／又はｍｉＲ－１７；リンパ系前駆細胞のＴ細胞への分化を駆動する目的で：ｍｉＲ－１５０；骨髄系前駆細胞の顆粒球への分化を遮断する目的で：ｍｉＲ－２２３；骨髄系前駆細胞の単球への分化を遮断する目的で：ｍｉＲ－１７－５ｐ、ｍｉＲ－２０ａ及び／又はｍｉＲ－１０６ａ；骨髄系前駆細胞の赤血球への分化を遮断する目的で：ｍｉＲ－１５０、ｍｉＲ－１５５、ｍｉＲ－２２１及び／又はｍｉＲ－２２２；かつ骨髄系前駆細胞の赤血球への分化を駆動する目的で：ｍｉＲ－４５１及び／又はｍｉＲ－１６。

【０２８３】

ドナーＤＮＡ及び／又は１つ以上の遺伝子編集ツール（例えば、本明細書の別の箇所で説明する）と一体に送達されうるシグナル伝達タンパク質（例．細胞外シグナル伝達タンパク質）の例については、図９Ｂ参照。例えば、以下のシグナル伝達タンパク質（例．細胞外シグナル伝達タンパク質）（例えば、タンパク質として、又はタンパク質をコードする核酸、例えば、ＤＮＡ若しくはＲＮＡとして送達される）は、以下の目的で使用されうる：造血幹細胞のリンパ系共通前駆細胞系統への分化を駆動する目的で：ＩＬ－７；造血幹細胞の骨髄系共通前駆細胞系統への分化を駆動する目的で：ＩＬ－３、ＧＭ－ＣＳＦ及び／又はＭ－ＣＳＦ；リンパ系共通前駆細胞のＢ細胞への分化を駆動する目的で：ＩＬ－３、ＩＬ－４及び／又はＩＬ－７；リンパ系共通前駆細胞のナチュラルキラー細胞への分化を駆動する目的で：ＩＬ－１５；リンパ系共通前駆細胞のＴ細胞への分化を駆動する目的で：ＩＬ－２、ＩＬ－７及び／又はＮｏｔｃｈ；リンパ系共通前駆細胞の樹状細胞への分化を駆動する目的で：Ｆｌｔ－３リガンド；骨髄系共通前駆細胞の樹状細胞への分化を駆動する目的で：Ｆｌｔ－３リガンド、ＧＭ－ＣＳＦ及び／又はＴＮＦα；骨髄系共通前駆細胞の顆粒球マクロファージ前駆細胞系統への分化を駆動する目的で：ＧＭ－ＣＳＦ；

骨髄系共通前駆細胞の、巨核細胞－赤血球系前駆細胞系統への分化を駆動する目的で：ＩＬ－３、ＳＣＦ及び／又はＴｐｏ；巨核細胞－赤血球系前駆細胞の巨核細胞への分化を駆動する目的で：ＩＬ－３、ＩＬ－６、ＳＣＦ及び／又はＴｐｏ；巨核細胞－赤血球系前駆細胞の赤血球への分化を駆動する目的で：エリスロポエチン；巨核細胞の血小板への分化を駆動する目的で：ＩＬ－１１及び／又はＴｐｏ；顆粒球マクロファージ前駆細胞の単球系統への分化を駆動する目的で：ＧＭ－ＣＳＦ及び／又はＭ－ＣＳＦ；顆粒球マクロファージ前駆細胞の骨芽細胞系統への分化を駆動する目的で：ＧＭ－ＣＳＦ；単球の単球由来樹状細胞への分化を駆動する目的で：Ｆｌｔ－３リガンド、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＦＮα及び／又はＩＬ－４；単球のマクロファージへの分化を駆動する目的で：ＩＦＮγ、ＩＬ－６、ＩＬ－１０及び／又はＭ－ＣＳＦ；骨芽細胞の好中球への分化を駆動する目的で：Ｇ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－６及び／又はＳＣＦ；骨芽細胞の好酸球への分化を駆動する目的で：ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＬ－３及び／又はＩＬ－５；かつ骨芽細胞の好塩基球への分化を駆動する目的で：Ｇ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦ及び／又はＩＬ－３。

【０２８４】

ドナーＤＮＡ及び／又は１つ以上の遺伝子編集ツール（例えば本明細書の別の箇所で説明する）と併せて送達されうる（例えば、タンパク質及び／又はタンパク質をコードする核酸、例えば、ＤＮＡ又はＲＮＡとして）タンパク質の例は、ＳＯＸ１７、ＨＥＸ、ＯＳＫＭ（Ｏｃｔ４／Ｓｏｘ２／Ｋｌｆ４／ｃ－ｍｙｃ）及び／又はｂＦＧＦ（例えば、肝幹細胞系統への分化を駆動する）；ＨＮＦ４ａ（例えば、肝細胞への分化を駆動する）；Ｐｏｌｙ（Ｉ：Ｃ）、ＢＭＰ－４、ｂＦＧＦ及び／又は８－Ｂｒ－ｃＡＭＰ（例えば、内皮幹細胞／前駆細胞系統への分化を駆動する）；ＶＥＧＦ（例えば、動脈内皮への分化を駆動する）；Ｓｏｘ－２、Ｂｒｎ４、Ｍｙｔ１ｌ、Ｎｅｕｒｏｄ２、Ａｓｃｌ１（例えば、神経幹細胞／前駆細胞系統への分化を駆動する）；並びにＢＤＮＦ、ＦＣＳ、ホルスコリン、及び／又はＳＨＨ（例えば、ニューロン、星状細胞及び／又は希突起膠細胞への分化を駆動する）を含むが、これらに限定されない。

【０２８５】

ドナーＤＮＡ及び／又は１つ以上の遺伝子編集ツール（例えば、本明細書の別の箇所で説明する）と併せて送達されうる（例えば、タンパク質及び／又はタンパク質をコードする核酸、例えば、ＤＮＡ又はＲＮＡとして）シグナル伝達タンパク質（例．細胞外シグナル伝達タンパク質）の例は、サイトカイン（例えばＣＤ８＋ Ｔ細胞を活性化させるための、例えばＩＬ－及び／又はＩＬ－１５）；Ｎｏｔｃｈ、Ｗｎｔ及び／又はＳｍａｄシグナル伝達経路のうちの１つ又は複数をモジュレートするリガンド及び／又はシグナル伝達タンパク質；ＳＣＦ；幹細胞プログラム化因子（例．Ｓｏｘ２、Ｏｃｔ３／４、Ｎａｎｏｇ、Ｋｌｆ４、ｃ－Ｍｙｃなど）；並びに、引続く単離／精製／濃縮のための一時的表面マーカー「タグ」及び／又は蛍光レポーターを含むが、これらに限定されない。例えば、線維芽細胞はＳｏｘ２の送達を介して神経幹細胞に転換されうるが、Ｏｃｔ３／４及び低分子である「後成的リセット因子」の存在下では心筋細胞になるであろう。ハンチントン病又はＣＸＣＲ４突然変異を伴う患者では、これらの線維芽細胞は、それぞれ、ニューロン及び心臓細胞と関連する罹患表現型形質をコードしうる。遺伝子編集補正及びこれらの因子を単一のパッケージ内で送達することにより、導入される因子／ペイロードの全てではないがこれらの１つ以上に起因する有害作用の危険性が著明に低減されうる。

【０２８６】

適用は、細胞死のキューが不成功の遺伝子編集を条件としてもよく、細胞の分化／増殖／活性化が、組織／臓器特異的プロモーター及び／又は外因性因子と関係づけられたin vivo法を含む。遺伝子編集を施される罹患細胞は活性化し増殖してもよいが、別のプロモーター駆動型発現カセット（例えば、腫瘍抑制因子、例えば、ｐ２１又はｐ５３の非存在と関係づけられた発現カセット）の存在によって、これらの細胞は、その後消失するであろう。他方、所望の特徴を発現する細胞は、所望の後代系統へとさらに分化するように誘発されてもよい。

【０２８７】

キット

キットもまた本発明の範囲内にある。例えば一部の場合、本発明のキットは、（ｉ）ドナーＤＮＡ；（ｉｉ）１つ以上の部位特異的ヌクレアーゼ（又はこれをコードする１つ以上の核酸）、例えば、ＺＦＮ対、ＴＡＬＥＮ対、ニカーゼであるＣａ９、Ｃｐｆ１など；（ｉｉｉ）ターゲティングリガンド、（ｉｖ）リンカー、（ｖ）リンカーへとコンジュゲートされたターゲティングリガンド、（ｖｉ）アンカードメイン（例．リンカーを伴う又は伴わない）へとコンジュゲートされたターゲティングリガンド、（ｖｉｉ）脱落層としての使用のための薬剤（例．シリカ）、（ｖｉｉｉ）さらなるペイロード、例えば、ｓｉＲＮＡ、又はｓｉＲＮＡ若しくはｓｈＲＮＡのための転写鋳型；遺伝子編集ツールなど、（ｉｘ）カチオン性ポリマーとして使用されうるポリマー、（ｘ）アニオン性ポリマーとして使用されうるポリマー、（ｘｉ）カチオン性ポリペプチドとして使用されうるポリペプチド、例えば、１つ以上のＨＴＰ、及び（ｘｉｉ）本発明のウイルス性又は非ウイルス性の送達媒体のうちの１つ又は複数（任意に組み合わされた）を含みうる。一部の場合、本発明のキットは使用のための指示書を含みうる。キットは、キットの内容物の意図された使用を指し示す表示を典型的に含む。「表示」という用語は、キット上若しくはキットと共に備えられるか、又は、他の形でキットに付随する書かれるか又は記録された任意の材料、例えば、コンピュータ読取り型メディアを含む。

【０２８８】

ナノ粒子合成についての第１の代表的な例

これらの操作は、滅菌の無粉塵環境（ＢＳＬ－ＩＩフード）内で実施した。気密性シリンジを７０％エタノールで滅菌処理してから、ヌクレアーゼ非含有水で３回すすぎ、使用する迄４℃で保管した。使用の前に表面をＲＮアーゼ阻害剤で処理した。

【０２８９】

ナノ粒子のコア

適量のペイロード（この場合、プラスミドＤＮＡ（ＥＧＦＰ－Ｎ１プラスミド））を、ポリ（D-グルタミン酸）とポリ（L-グルタミン酸）の水性混合物（「アニオン性ポリマー組成物」）と組み合わせることにより、第１の溶液（アニオン性溶液）を調製した。この溶液をｐＨ８．５の１０ｍＭのトリス－ＨＣｌで適正な容量に希釈した。「カチオン性ポリマー組成物」と「カチオン性ポリペプチド組成物」の組合せである第２の溶液（カチオン性溶液）は、適量の凝縮剤を含有する濃縮溶液をｐＨ５．５の６０ｍＭのＨＥＰＥＳで適正な容量へと希釈することにより調製した。この場合、「カチオン性ポリマー組成物」はポリ（L-アルギニン）で、「カチオン性ポリペプチド組成物」は１６μｇのＨ３Ｋ４（ｍｅ３）（Ｋ４においてトリメチル化されたヒストンＨ３のテール）であった。

【０２９０】

２００μｌ未満のバッチにおけるナノ粒子コアの沈殿を、凝縮溶液のガラスバイアル又は低タンパク質結合性遠心管内のペイロード溶液への滴下による添加により行った後、４℃で３０分間インキュベーションした。２００μｌを超えるバッチについては、（例えば、標準的な混合チップ（例えば、Dolomite Micromixer）又は流体力学的フローフォーカシングチップを使用して）２つの溶液をマイクロ流体フォーマットで組み合わせることができる。最適のインプット流量は、得られたナノ粒子コアの懸濁液が単分散性で、１００ｎｍを下回る平均値粒子サイズを呈するように決定することができる。

【０２９１】

この場合、混合のために、上記２つの等容量溶液（カチオン性凝縮剤の溶液及びアニオン性凝縮剤の溶液）を調製した。カチオン性凝縮剤の溶液のために、ポリマー／ペプチド溶液を１つのタンパク質低結合性チューブ（エッペンドルフ管）に添加し、次いで６０ｍＭのＨＥＰＥＳ（ｐＨ５．５）で総容量１００μｌに希釈した（上述のとおり）。アニオン性溶液を調製する間、この溶液を室温で保存した。アニオン性凝縮剤の溶液のために、アニオン性溶液を光への曝露を最小限とする氷上で冷却した。水溶液中に１０μｇの核酸（約１μｇ／μｌ）及び７μｇの水性ポリ（D-グルタミン酸）［０．１％］を、１０ｍＭのトリス－ＨＣｌ（ｐＨ８．５）で総容量１００μｌに希釈した（上述のとおり）。

【０２９２】
０．２ミクロンのシリンジフィルターを使用して２つの溶液の各々を濾過し、元のHamilton製の１ｍｌ気密性シリンジ（ガラス（製品番号を挿入する））に移した。各シリンジをHarvard Pump 11 Elite Dual Syringe Pumpに取り付けた。チューブを使用して、シリンジをDolomite Micro Mixerチップの適切な注入口へと接続し、シリンジポンプを１２０μｌ／分で１００μｌの総容量にわたり作動させた。得られた溶液は、コア組成物（ここでは、核酸ペイロード、アニオン性構成要素及びカチオン性構成要素を含む）を含んだ。
【０２９３】
コアの安定化（脱落層の追加）
コアを脱落層でコーティングするために、得られたナノ粒子コアの懸濁液を１０ｍＭのトリスＨＣｌ（ｐＨ８．５、１０～５００ｍＭ）中のケイ酸ナトリウム、又は１０ｍＭのＰＢＳ（ｐＨ８．５、１０～５００ｍＭ）中の塩化カルシウムの希釈液と組み合わせ、室温で１～２分間インキュベートした。この場合、コア組成物を希釈ケイ酸ナトリウム溶液に添加し、コアをポリマー性シリカの酸不安定性コーティング（脱落層の例）でコーティングした。このようにするために、原液のケイ酸ナトリウム（Sigma）１０μｌを、まずトリス緩衝液（１０ｍＭのトリスｐＨ＝８．５、１：２００希釈率）１．９９ｍｌ中で溶解させ、完全に混合した。滅菌０．１ミクロンシリンジフィルターを使用してケイ酸塩溶液を濾過し、Hamilton製の滅菌気密性シリンジに移し、これをシリンジポンプに取り付けた。上記によるコア組成物もまたHamilton製の滅菌気密性シリンジに移し、これもシリンジポンプに取り付けた。ＰＴＦＥチューブを使用してシリンジをDolomite Micro Mixerチップの適切な注入口へと接続し、シリンジポンプを１２０μｌ／分で作動させた。
【０２９４】
安定化させた（コーティングされた）コアは、標準的な遠心濾過デバイス（１００ｋＤａ Amicon Ultra、Millipore）又は高分子量カットオフ膜を使用して、３０ｍＭのＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．４）中で透析により精製することができる。この場合、安定化させた（コーティングされた）コアは遠心濾過デバイスを使用して精製した。回収されたコーティングナノ粒子（ナノ粒子溶液）を希釈ＰＢＳ（１：８００）又はＨＥＰＥＳで洗浄し、再度濾過した（溶液は、保管のために５００μｌの滅菌分散緩衝液又はヌクレアーゼ非含有水中に再懸濁させることができる）。効果的なシリカコーティングが裏付けられた。安定化させたコアは、１１０．６ｎｍのサイズ及び－４２．１ｍＶ（９５％）のゼータ電位を有した。
【０２９５】
表面コート（外殻）
場合によって「表面官能化」と呼ばれる表面コート（外殻とも呼ばれる）の追加は、リガンド分子種（この場合、カチオン性アンカードメインとしての９－Ａｒｇペプチド配列へと融合させた、狂犬病ウイルス糖タンパク質（「ＲＶＧ９Ｒ」））を安定化させた（この場合、シリカコーティングされた）ナノ粒子の負に帯電した表面へと、静電的にグラフトすることにより達成した。濾過され、緩衝液又は水中に再懸濁されたシリカコーティングナノ粒子から始めて、プロトン化アミン基の最終濃度が少なくとも７５ｕＭとなるように、添加すべきポリマー又はペプチドの量及び各ナノ粒子分散液の最終容量を決定した。所望の表面成分を添加し、溶液を２０～３０秒間超音波処理してから、１時間インキュベートした。遠心濾過は３００ｋＤａで実施し（最終産物は、標準的な遠心濾過デバイス、例えばAmicon Ultra Milliporeの３００～５００ｋＤａ型デバイス、又は、例えば高分子量カットオフ膜を使用する３０ｍＭのＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．４）中の透析を使用して精製することができる）、最終的な再懸濁は、細胞培養培地又は分散緩衝液中の再懸濁であった。一部の場合、最適の外殻の追加は、平均値粒子サイズを５０～１５０ｎｍの間とし、ゼータ電位を０～－１０ｍＶの間とする粒子の単分散懸濁液をもたらす。この場合、外殻を伴うナノ粒子は、１１５．８ｎｍのサイズ及び－３．１ｍＶ（１００％）のゼータ電位を有した。
【０２９６】

ナノ粒子合成についての第２の代表的な例

ナノ粒子は、室温で、３７℃で、又はカチオン性及びアニオン性構成要素の間で３７℃と室温の差をつけて合成した。溶液は、カチオン性及びアニオン性構成要素の混合時における天然の静電相互作用を利用して、水性緩衝液中で調製した。開始時に、アニオン性構成要素をトリス緩衝液（３０ｍＭ～６０ｍＭ；ｐＨ＝７．４～９）又はＨＥＰＥＳ緩衝液（３０ｍＭ、ｐＨ＝５．５）中に溶解させる一方で、カチオン性構成要素をＨＥＰＥＳ緩衝液（３０ｍＭ～６０ｍＭ、ｐＨ＝５～６．５）中に溶解させた。

【０２９７】

具体的には、ペイロード（例．遺伝子素材（ＲＮＡ又はＤＮＡ）、遺伝子素材－タンパク質－核局在化シグナルポリペプチド複合体（リボ核タンパク質）又はポリペプチド）を、塩基性、中性又は酸性緩衝液中で復元した。解析を目的として、ペイロードをフルオロフォアで共有結合的にタグ付けされるか又はフルオロフォアを遺伝子コードするように製造した。ｐＤＮＡのペイロードでは、ＡＧＡＧＡＧタンデムリピートに特異的なＣｙ５タグ付けペプチド核酸（ＰＮＡ）を蛍光レポーターベクター及び蛍光レポーター－治療用遺伝子ベクターを蛍光タグ付けするのに使用した。負に帯電した凝縮分子種（例．ポリ（グルタミン酸））としても用いられる徐放型構成要素もまた、塩基性、中性又は酸性緩衝液中で復元した。リンカー－アンカー配列へとコンジュゲートした、野生型に由来するか又は野生型から突然変異させたターゲティングペプチドを伴うターゲティングリガンドを、酸性緩衝液中で復元した。さらなる凝縮分子種又は核局在化シグナルペプチドをナノ粒子内に組み入れる場合は、これらもまた、カチオン性分子種には０．０３％ｗ／ｖであり、アニオン性分子種には０．０１５％ｗ／ｖである作業溶液としての緩衝液中で復元した。実験は、カチオン性分子種に０．１％ｗ／ｖであり、アニオン性分子種に０．１％ｗ／ｖである作業溶液によっても行った。遺伝子素材と複合体化するポリペプチドを除き、全てのポリペプチドを１０分間超音波処理し、可溶性を改善した。

【０２９８】

本発明の代表的非限定的側面

上記本対象物の態様を含む側面は、単独で有益であってもよく、１つ以上の他の側面又は態様と組み合わせて有益であってもよい。前出の記載を限定せずに述べると、本開示のある特定の非限定側面は、下記のセットＡ及びセットＢに提示される。本明細書を読んだ当業者には明らかなように、個別に番号付けされた側面の各々は、先行又は後続する個別に番号付けされた側面のうちのいずれかと共に使用されるか又は組み合わされてもよい。これは、側面の全てのこのような組合せに裏付けを与えるように意図されるものであり、下記に明示的に提示される側面の組合せに限定するように意図されるものではない。当業者には、本発明の精神又は範囲から逸脱しない限りにおいて、多様な変化及び改変がなされうることが明らかであろう。

【０２９９】

セットＡ

１．標的細胞のゲノム編集方法であって、

（ａ）標的細胞のゲノム内の２か所で付着末端を伴う二本鎖切断を生成し、これにより、第１のゲノム付着末端及び第２のゲノム付着末端を生じさせること；並びに

（ｂ）標的細胞に、各末端に５’又は３’突出を有する直鎖状の二本鎖ドナーＤＮＡを導入すること

を含み、

ドナーＤＮＡの１つの末端が第１のゲノム付着末端とハイブリダイズし、ドナーＤＮＡの他の末端が第２のゲノム付着末端とハイブリダイズし、この結果として、直鎖状の二本鎖ドナーＤＮＡの、標的細胞のゲノムへの挿入をもたらす

方法。

２．ドナーＤＮＡの少なくとも１つの末端が５’突出を有し、ゲノム付着末端のうちの少なくとも１つが５’突出を有する、１に記載の方法。

３．ドナーＤＮＡの少なくとも１つの末端が３’突出を有し、ゲノム付着末端のうちの少

なくとも１つが３’突出を有する、１又は２に記載の方法。
４．前記生成することが、１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼ、又は１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼをコードする１つ以上の核酸を、標的細胞に導入して、前記二本鎖切断を生成することを含む、１から３のいずれか１つに記載の方法。
５．１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼが、メガヌクレアーゼ、ホーミングエンドヌクレアーゼ、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、及び転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）のうちの少なくとも１つを含む、４に記載の方法。
６．１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼが、付着末端切断性ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエフェクタータンパク質を含む、４に記載の方法。
７．前記生成することが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓガイド核酸、又はＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓガイド核酸をコードする核酸を、細胞に導入することをさらに含む、６に記載の方法。
８．方法が、同じ送達媒体のペイロードとして、（ｉ）１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼ、又は１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼをコードする１つ以上の核酸、及び（ｉｉ）直鎖状の二本鎖ドナーＤＮＡを、細胞に導入することを含む、４から７のいずれか１つに記載の方法。
９．細胞に、１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼ及び直鎖状の二本鎖ドナーＤＮＡを、デオキシリボヌクレオタンパク質複合体又はリボ－デオキシリボヌクレオタンパク質複合体として導入する、８に記載の方法。
１０．前記導入することにおいて、ドナーＤＮＡの末端を、１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼに、部位特異的に結合させる、８又は９に記載の方法。
【０３００】
１１．送達媒体が、非ウイルス性である、８から１０のいずれか１つに記載の方法。
１２．送達媒体が、ナノ粒子である、８から１１のいずれか１つに記載の方法。
１３．（ｉ）及び（ｉｉ）に加えて、ナノ粒子が、アニオン性ポリマー組成物、カチオン性ポリマー組成物、及びカチオン性ポリペプチド組成物を含むコアを含む、１２に記載の方法。
１４．前記アニオン性ポリマー組成物が、ポリ（グルタミン酸）及びポリ（アスパラギン酸）から選択されるアニオン性ポリマーを含む、１３に記載の方法。
１５．前記カチオン性ポリマー組成物が、ポリ（アルギニン）、ポリ（リシン）、ポリ（ヒスチジン）、ポリ（オルニチン）、及びポリ（シトルリン）から選択されるカチオン性ポリマーを含む、１３又は１４に記載の方法。
１６．ナノ粒子が、コアを封入する脱落層をさらに含む、１３から１５のいずれか１つに記載の方法。
１７．脱落層が、アニオン性コート又はカチオン性コートである、１６に記載の方法。
１８．脱落層が、シリカ、ペプトイド、ポリシステイン、カルシウム、酸化カルシウム、ヒドロキシアパタイト、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、マンガン、酸化マンガン、リン酸マンガン、硫酸マンガン、マグネシウム、酸化マグネシウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、鉄、酸化鉄、リン酸鉄、及び硫酸鉄のうちの１つ又は複数を含む、１６又は１７に記載の方法。
１９．ナノ粒子が、脱落層を取り囲む表面コートをさらに含む、１６から１８のいずれか１つに記載の方法。
２０．表面コートが、脱落層と静電相互作用するカチオン性又はアニオン性のアンカードメインを含む、１９に記載の方法。
【０３０１】
２１．表面コートが、１つ以上のターゲティングリガンドを含む、１９又は２０に記載の方法。
２２．表面コートが、狂犬病ウイルス糖タンパク質（ＲＶＧ）断片、ＡｐｏＥ－トランスフェリン、ラクトフェリン、メラノフェリチン、オボトランスフェリチン、L-セレクチン、E-セレクチン、P-セレクチン、シアル化ペプチド、ポリシアル化Ｏ結合型ペプチド、ＴＰＯ、ＥＰＯ、ＰＳＧＬ－１、ＥＳＬ－１、ＣＤ４４、死受容体３（ＤＲ３）、ＬＡＭＰ

１、ＬＡＭＰ２、Ｍａｃ２－ＢＰ、幹細胞因子（ＳＣＦ）、ＣＤ７０、ＳＨ２ドメイン含有タンパク質１Ａ（ＳＨ２Ｄ１Ａ）、エキセンディン－４、ＧＬＰ１、ＲＧＤ、トランスフェリンリガンド、ＦＧＦ断片、コハク酸、ビスホスホネート、造血幹細胞走化性脂質、スフィンゴシン、セラミド、スフィンゴシン-1-リン酸、セラミド-1-リン酸、及びこれらの活性ターゲティング断片からなる群から選択される１つ以上のターゲティングリガンドを含む、１９又は２０に記載の方法。

２３．表面コートが、ＣＤ３、ＣＤ２８、ＣＤ９０、ＣＤ４５ｆ、ＣＤ３４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ；ＴＣＲα、ＴＣＲβ、ＴＣＲγ、及び／又はＴＣＲδの定常領域；４－１ＢＢ、ＯＸ４０、ＯＸ４０Ｌ、ＣＤ６２Ｌ、ＡＲＰ５、ＣＣＲ５、ＣＣＲ７、ＣＣＲ１０、ＣＸＣＲ３、ＣＸＣＲ４、ＣＤ９４／ＮＫＧ２、ＮＫＧ２Ａ、ＮＫＧ２Ｂ、ＮＫＧ２Ｃ、ＮＫＧ２Ｅ、ＮＫＧ２Ｈ、ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫＧ２Ｆ、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ４６、ＮＫｐ３０、ＤＮＡＭ、ＸＣＲ１、ＸＣＬ１、ＸＣＬ２、ＩＬＴ、ＬＩＲ、Ｌｙ４９、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＴＮＦα、ＩＦＮγ、ＴＧＦ－β、及びα５β１から選択される標的に対する結合を提供する１つ以上のターゲティングリガンドを含む、１９又は２０に記載の方法。

２４．表面コートが、骨髄細胞、造血幹細胞（ＨＳＣ）、造血幹／前駆細胞（ＨＳＰＣ）、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）、骨髄系前駆細胞、リンパ系前駆細胞、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫＴ細胞、ＮＫ細胞、樹状細胞、単球、顆粒球、赤血球、巨核細胞、マスト細胞、好塩基球、好酸球、好中球、マクロファージ、赤血球系前駆細胞、巨核細胞－赤血球系前駆細胞（ＭＥＰ）、骨髄系共通前駆細胞（ＣＭＰ）、複能性前駆細胞（ＭＰＰ）、造血幹細胞（ＨＳＣ）、短期ＨＳＣ（ＳＴ－ＨＳＣ）、ＩＴ－ＨＳＣ、長期ＨＳＣ（ＬＴ－ＨＳＣ）、内皮細胞、ニューロン、星状細胞、膵細胞、膵島β細胞、肝臓細胞、筋肉細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、肝細胞、脂肪細胞、腸細胞、結腸細胞、及び胃細胞から選択される標的細胞に対する結合を提供する１つ以上のターゲティングリガンドを含む、１９又は２０に記載の方法。

２５．送達媒体が、ペイロードへとコンジュゲートされたターゲティングリガンドであり、ターゲティングリガンドが、細胞表面タンパク質に対する結合を提供する、８から１０のいずれか１つに記載の方法。

２６．送達媒体が、帯電ポリマーであるポリペプチドドメインへとコンジュゲートされたターゲティングリガンドであり、ターゲティングリガンドが、細胞表面タンパク質に対する結合を提供し、帯電ポリマーであるポリペプチドドメインが、核酸ペイロードと共に凝縮され、及び／又はタンパク質ペイロードと静電相互作用する、８から１０のいずれか１つに記載の方法。

２７．ターゲティングリガンドが、ペプチド、ＳｃＦｖ、Ｆ（ａｂ）、核酸アプタマー、又はペプトイドである、２５又は２６に記載の方法。

２８．帯電ポリマーであるポリペプチドドメインのアミノ酸長が３～３０である、２６に記載の方法。

２９．送達媒体が、ペイロード、及び帯電ポリマーであるポリペプチドドメインと相互作用するアニオン性ポリマーをさらに含む、２６から２８のいずれか１つに記載の方法。

３０．アニオン性ポリマーが、ポリ（グルタミン酸）及びポリ（アスパラギン酸）から選択される、２９に記載の方法。

【０３０２】

３１．ターゲティングリガンドのアミノ酸長が５～５０である、２５から３０のいずれか１つに記載の方法。

３２．ターゲティングリガンドが、Ｇタンパク質共役型受容体（ＧＰＣＲ）ファミリーＢ、受容体チロシンキナーゼ（ＲＴＫ）、細胞表面糖タンパク質及び細胞間接着分子から選択される細胞表面タンパク質に対する結合を提供する、２５から３１のいずれか１つに記載の方法。

３３．ターゲティングリガンドが、狂犬病ウイルス糖タンパク質（ＲＶＧ）断片、ＡｐｏＥ－トランスフェリン、ラクトフェリン、メラノフェリチン、オボトランスフェリチン、

Ｌ－セレクチン、E-セレクチン、P-セレクチン、シアル化ペプチド、ポリシアル化Ｏ結合型ペプチド、ＴＰＯ、ＥＰＯ、ＰＳＧＬ－１、ＥＳＬ－１、ＣＤ４４、死受容体３（ＤＲ３）、ＬＡＭＰ１、ＬＡＭＰ２、Ｍａｃ２－ＢＰ、幹細胞因子（ＳＣＦ）、ＣＤ７０、ＳＨ２ドメイン含有タンパク質１Ａ（ＳＨ２Ｄ１Ａ）、エキセンディン－４、ＧＬＰ１、ＲＧＤ、トランスフェリンリガンド、ＦＧＦ断片、コハク酸、ビスホスホネート、造血幹細胞走化性脂質、スフィンゴシン、セラミド、スフィンゴシン-1-リン酸、セラミド-1-リン酸、及びこれらの活性ターゲティング断片からなる群から選択される、２５から３１のいずれか１つに記載の方法。

３４．ターゲティングリガンドが、ＣＤ３、ＣＤ２８、ＣＤ９０、ＣＤ４５ｆ、ＣＤ３４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ；ＴＣＲα、ＴＣＲβ、ＴＣＲγ、及び／又はＴＣＲδの定常領域；４－１ＢＢ、ＯＸ４０、ＯＸ４０Ｌ、ＣＤ６２Ｌ、ＡＲＰ５、ＣＣＲ５、ＣＣＲ７、ＣＣＲ１０、ＣＸＣＲ３、ＣＸＣＲ４、ＣＤ９４／ＮＫＧ２、ＮＫＧ２Ａ、ＮＫＧ２Ｂ、ＮＫＧ２Ｃ、ＮＫＧ２Ｅ、ＮＫＧ２Ｈ、ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫＧ２Ｆ、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ４６、ＮＫｐ３０、ＤＮＡＭ、ＸＣＲ１、ＸＣＬ１、ＸＣＬ２、ＩＬＴ、ＬＩＲ、Ｌｙ４９、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＴＮＦα、ＩＦＮγ、ＴＧＦ－β、及びα５β１から選択される標的に対する結合を提供する、２５から３１のいずれか１つに記載の方法。

３５．ターゲティングリガンドが、骨髄細胞、造血幹細胞（ＨＳＣ）、長期ＨＳＣ、短期ＨＳＣ、造血幹／前駆細胞（ＨＳＰＣ）、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）、骨髄系前駆細胞、リンパ系前駆細胞、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫＴ細胞、ＮＫ細胞、樹状細胞、単球、顆粒球、赤血球、巨核細胞、マスト細胞、好塩基球、好酸球、好中球、マクロファージ、赤血球系前駆細胞（例．ＨＵＤＥＰ細胞）、巨核細胞－赤血球系前駆細胞（ＭＥＰ）、骨髄系共通前駆細胞（ＣＭＰ）、複能性前駆細胞（ＭＰＰ）、造血幹細胞（ＨＳＣ）、短期ＨＳＣ（ＳＴ－ＨＳＣ）、ＩＴ－ＨＳＣ、長期ＨＳＣ（ＬＴ－ＨＳＣ）、内皮細胞、ニューロン、星状細胞、膵細胞、膵島β細胞、筋肉細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、肝細胞、脂肪細胞、腸細胞、結腸細胞、及び胃細胞からなる群から選択される細胞への結合をもたらす、２５から３１のいずれか１つに記載の方法。

３６．標的細胞のゲノム内の前記２か所で二本鎖切断を生成する前の前記２か所の間隔が、１，０００，０００塩基対以下である、１から３５のいずれか１つに記載の方法。

３７．標的細胞のゲノム内の前記２か所で二本鎖切断を生成する前の前記２か所の間隔が、１００，０００塩基対以下である、１から３５のいずれか１つに記載の方法。

３８．ドナーＤＮＡが、合計１０塩基対（ｂｐ）～１００キロ塩基対（ｋｂｐ）である、１から３５のいずれか１つに記載の方法。

３９．ドナーＤＮＡの挿入が、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）タンパク質をコードするヌクレオチド配列内で生じる、１から３８のいずれか１つに記載の方法。

４０．ドナーＤＮＡが、ＴＣＲタンパク質のＣＤＲ１、ＣＤＲ２又はＣＤＲ３領域のアミノ酸をコードする、３９に記載の方法。

【０３０３】

４１．ドナーＤＮＡが、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードするヌクレオチド配列を含み、前記ドナーＤＮＡの挿入が、ＣＡＲをコードするヌクレオチド配列の内因性Ｔ細胞プロモーターへの作動可能な連結をもたらす、１から３８のいずれか１つに記載の方法。

４２．ドナーＤＮＡが、プロモーターに作動可能に連結し、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードするヌクレオチド配列を含む、１から３８のいずれか１つに記載の方法。

４３．ドナーＤＮＡが、膜に結合し細胞外に提示される細胞特異的ターゲティングリガンドをコードするヌクレオチド配列を含み、前記ドナーＤＮＡの挿入が、細胞特異的ターゲティングリガンドをコードするヌクレオチド配列の内因性プロモーターへの作動可能な連結をもたらす、１から３８のいずれか１つに記載の方法。

４４．ドナーＤＮＡが、膜に結合し細胞外に提示される細胞特異的ターゲティングリガンドをコードする配列に作動可能に連結するプロモーターを含む、１から３８のいずれか１つに記載の方法。

４５．方法が、
標的細胞のゲノム内の４か所で付着末端を伴う二本鎖切断を生成し、これにより、第１及び第２のゲノム付着末端に加えて、第３のゲノム付着末端及び第４のゲノム付着末端を生じさせること；並びに
各々が、各末端に５’又は３’突出を有する２つの直鎖状の二本鎖ドナーＤＮＡを導入すること
を含み、
１つのドナーＤＮＡの末端が第１及び第２のゲノム付着末端とハイブリダイズし、他のドナーＤＮＡの末端が第３及び第４のゲノム付着末端とハイブリダイズし、
これにより、前記２つのドナーＤＮＡの、標的細胞のゲノムへの挿入をもたらす、１から３８のいずれか１つに記載の方法。
４６．１つのドナーＤＮＡの挿入が、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α又はδサブユニットをコードするヌクレオチド配列内で生じ、他のドナーＤＮＡの挿入が、ＴＣＲβ又はγサブユニットをコードするヌクレオチド配列内で生じる、４５に記載の方法。
４７．１つのドナーＤＮＡの挿入が、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α又はδサブユニットの定常領域をコードするヌクレオチド配列内で生じ、他のドナーＤＮＡの挿入が、ＴＣＲβ又はγサブユニットの定常領域をコードするヌクレオチド配列内で生じる、４５に記載の方法。
４８．１つのドナーＤＮＡの挿入が、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α又はδサブユニットのプロモーターとして機能するヌクレオチド配列内で生じ、他のドナーＤＮＡの挿入が、ＴＣＲβ又はγサブユニットのプロモーターとして機能するヌクレオチド配列内で生じる、４５に記載の方法。
４９．前記ドナーＤＮＡの挿入が、挿入されたドナーＤＮＡの、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α、β、γ、又はδの内因性プロモーターとの作動可能な連結をもたらす、１から４８のいずれか１つに記載の方法。
５０．ドナーＤＮＡが、ＴＣＲα、β、γ、又はδのプロモーターに作動可能に連結するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、１から４８のいずれか１つに記載の方法。
【０３０４】
５１．前記ドナーＤＮＡの挿入が、挿入されたドナーＤＮＡの、ＣＤ３又はＣＤ２８プロモーターとの作動可能な連結をもたらす、１から４８のいずれか１つに記載の方法。
５２．ドナーＤＮＡが、Ｔ細胞特異的プロモーターに作動可能に連結するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、１から４８のいずれか１つに記載の方法。
５３．ドナーＤＮＡが、プロモーターに作動可能に連結するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、１から４８のいずれか１つに記載の方法。
５４．前記ドナーＤＮＡの挿入が、挿入されたドナーＤＮＡの幹細胞又は体細胞特異的な内因性プロモーターとの作動可能な連結をもたらす、１から４８のいずれか１つに記載の方法。
５５．ドナーＤＮＡが、（例えば、遺伝子編集効率を評価するための、）レポータータンパク質（例えば、近赤外及び／又は遠赤色レポータータンパク質）をコードするヌクレオチド配列を含む、１から５４のいずれか１つに記載の方法。
５６．前記ドナーＤＮＡの挿入が、挿入されたドナーＤＮＡの内因性プロモーターとの作動可能な連結をもたらす、５５に記載の方法。
５７．ドナーＤＮＡが、レポータータンパク質をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結するプロモーターを含む、５５に記載の方法。
５８．ドナーＤＮＡが、イントロンを有さないタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、１から５７のいずれか１つに記載の方法。
５９．イントロンを有さないヌクレオチド配列が、ＴＣＲタンパク質の、全体又は一部分をコードする、５８に記載の方法。
６０．ドナーＤＮＡが、少なくとも１つのアデニル化３’末端を有する、１から５９のい

ずれか１つに記載の方法。
【０３０５】
６１．標的細胞が、哺乳動物細胞である、１から６０のいずれか１つに記載の方法。
６２．標的細胞が、ヒト細胞である、１から６１のいずれか１つに記載の方法。
６３．（ａ）各末端に５’又は３’突出を有する直鎖状の二本鎖ドナーＤＮＡ；及び
（ｂ）配列特異的ヌクレアーゼ、又は配列特異的ヌクレアーゼをコードする核酸
を含み、
（ａ）及び（ｂ）が、同じ送達媒体の一部としてのペイロードである、
キット又は組成物。
６４．送達媒体が、ナノ粒子である、６３に記載のキット又は組成物。
６５．ナノ粒子が、（ａ）、（ｂ）、アニオン性ポリマー組成物、カチオン性ポリマー組成物、及びカチオン性ポリペプチド組成物を含むコアを含む、６４に記載のキット又は組成物。
６６．ナノ粒子が、ナノ粒子を細胞表面タンパク質にターゲティングするターゲティングリガンドを含む、６４又は６５に記載のキット又は組成物。
６７．直鎖状二本鎖内ドナーと配列特異的ヌクレアーゼが互いに結合して、デオキシリボヌクレオタンパク質又はリボ－デオキシリボヌクレオタンパク質複合体を形成する、６３から６６のいずれか１つに記載のキット又は組成物。
６８．送達媒体が、帯電ポリマーであるポリペプチドドメインへとコンジュゲートされたターゲティングリガンドであり、ターゲティングリガンドが、細胞表面タンパク質に対する結合を提供し、帯電ポリマーであるポリペプチドドメインが、ペイロードと静電相互作用する、６３から６７のいずれか１つに記載のキット又は組成物。
６９．送達媒体が、ペイロード、及び帯電ポリマーであるポリペプチドドメインと相互作用するアニオン性ポリマーをさらに含む、６８に記載のキット又は組成物。
【０３０６】
７０．送達媒体が、（ａ）及び／又は（ｂ）とコンジュゲートしたターゲティングリガンドであり、ターゲティングリガンドが、細胞表面タンパク質に対する結合を提供する、６３から６７のいずれか１つに記載のキット又は組成物。
７１．送達媒体が、水中油中水エマルジョン粒子、水中油エマルジョンミセル粒子、多重膜型水中油中水エマルジョン粒子、多層型粒子又はＤＮＡオリガミナノボットをコーティングする、ターゲティングリガンドを含む、６３から６７のいずれか１つに記載のキット又は組成物。
７２．ターゲティングリガンドが、ペプチド、ＳｃＦｖ、Ｆ（ａｂ）、核酸アプタマー、又はペプトイドである、６６から７１のいずれか１つに記載の方法。
７３．送達媒体が、非ウイルス性である、６３から６７のいずれか１つに記載のキット又は組成物。
【０３０７】
セットＢ
１．標的細胞のゲノム編集方法であって、
（ａ）標的細胞のゲノム内の２か所で付着末端を伴う二本鎖切断を生成し、これにより、第１のゲノム付着末端及び第２のゲノム付着末端を生じさせること；並びに
（ｂ）標的細胞に、各末端に５’又は３’突出を有する直鎖状の二本鎖ドナーＤＮＡを導入すること
を含み、
ドナーＤＮＡの１つの末端が第１のゲノム付着末端とハイブリダイズし、ドナーＤＮＡの他の末端が第２のゲノム付着末端とハイブリダイズし、この結果として、直鎖状の二本鎖ドナーＤＮＡの、標的細胞のゲノムへの挿入をもたらす
方法。
２．ドナーＤＮＡの少なくとも１つの末端が５’突出を有し、ゲノム付着末端のうちの少なくとも１つが５’突出を有する、１に記載の方法。

３．ドナーＤＮＡの少なくとも１つの末端が３’突出を有し、ゲノム付着末端のうちの少なくとも１つが３’突出を有する、１又は２に記載の方法。
４．前記生成することが、１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼ、又は１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼをコードする１つ以上の核酸を、標的細胞に導入して、前記二本鎖切断を生成することを含む、１から３のいずれか１つに記載の方法。
５．１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼが、メガヌクレアーゼ、ホーミングエンドヌクレアーゼ、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（ＺＦＮ）、及び転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（ＴＡＬＥＮ）のうちの少なくとも１つを含む、４に記載の方法。
６．１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼが、付着末端切断性ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓエフェクタータンパク質を含む、４に記載の方法。
７．前記生成することが、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓガイド核酸、又はＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓガイド核酸をコードする核酸を、細胞に導入することをさらに含む、６に記載の方法。
８．方法が、同じ送達媒体のペイロードとして、（ｉ）１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼ、又は１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼをコードする１つ以上の核酸、及び（ｉｉ）直鎖状の二本鎖ドナーＤＮＡを、細胞に導入することを含む、４から７のいずれか１つに記載の方法。
９．細胞に、１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼ及び直鎖状の二本鎖ドナーＤＮＡを、デオキシリボヌクレオタンパク質複合体又はリボ－デオキシリボヌクレオタンパク質複合体として導入する、８に記載の方法。
１０．前記導入することにおいて、ドナーＤＮＡの末端を、１つ以上の配列特異的ヌクレアーゼに、部位特異的に結合させる、８又は９に記載の方法。

【０３０８】

１１．送達媒体が、非ウイルス性である、８から１０のいずれか１つに記載の方法。
１２．送達媒体が、ナノ粒子である、８から１１のいずれか１つに記載の方法。
１３．（ｉ）及び（ｉｉ）に加えて、ナノ粒子が、アニオン性ポリマー組成物、カチオン性ポリマー組成物、及びカチオン性ポリペプチド組成物を含むコアを含む、１２に記載の方法。
１４．前記アニオン性ポリマー組成物が、ポリ（グルタミン酸）及びポリ（アスパラギン酸）から選択されるアニオン性ポリマーを含む、１３に記載の方法。
１５．前記カチオン性ポリマー組成物が、ポリ（アルギニン）、ポリ（リシン）、ポリ（ヒスチジン）、ポリ（オルニチン）、及びポリ（シトルリン）から選択されるカチオン性ポリマーを含む、１３又は１４に記載の方法。
１６．ナノ粒子が、コアを封入する脱落層をさらに含む、１３から１５のいずれか１つに記載の方法。
１７．脱落層が、アニオン性コート又はカチオン性コートである、１６に記載の方法。
１８．脱落層が、シリカ、ペプトイド、ポリシステイン、カルシウム、酸化カルシウム、ヒドロキシアパタイト、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、マンガン、酸化マンガン、リン酸マンガン、硫酸マンガン、マグネシウム、酸化マグネシウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、鉄、酸化鉄、リン酸鉄、及び硫酸鉄のうちの１つ又は複数を含む、１６又は１７に記載の方法。
１９．ナノ粒子が、脱落層を取り囲む表面コートをさらに含む、１６から１８のいずれか１つに記載の方法。
２０．表面コートが、脱落層と静電相互作用するカチオン性又はアニオン性のアンカードメインを含む、１９に記載の方法。

【０３０９】

２１．表面コートが、１つ以上のターゲティングリガンドを含む、１９又は２０に記載の方法。
２２．表面コートが、狂犬病ウイルス糖タンパク質（ＲＶＧ）断片、ＡｐｏＥ－トランスフェリン、ラクトフェリン、メラノフェリチン、オボトランスフェリチン、L-セレクチン、E-セレクチン、P-セレクチン、シアル化ペプチド、ポリシアル化Ｏ結合型ペプチド、Ｔ

ＰＯ、ＥＰＯ、ＰＳＧＬ－１、ＥＳＬ－１、ＣＤ４４、死受容体３（ＤＲ３）、ＬＡＭＰ１、ＬＡＭＰ２、Ｍａｃ２－ＢＰ、幹細胞因子（ＳＣＦ）、ＣＤ７０、ＳＨ２ドメイン含有タンパク質１Ａ（ＳＨ２Ｄ１Ａ）、エキセンディン、エキセンディン－Ｓ１１Ｃ、ＧＬＰ１、ＲＧＤ、トランスフェリンリガンド、ＦＧＦ断片、α５β１リガンド、ＩＬ２、Ｃｄｅ３ε、ペプチド－ＨＬＡ－Ａ＊２４０２、ＣＤ８０、ＣＤ８６、コハク酸、ビスホスホネート、造血幹細胞走化性脂質、スフィンゴシン、セラミド、スフィンゴシン-1-リン酸、セラミド-1-リン酸、及びこれらの活性ターゲティング断片からなる群から選択される１つ以上のターゲティングリガンドを含む、１９又は２０に記載の方法。

２３．表面コートが、ＣＤ３、ＣＤ８、ＣＤ４、ＣＤ２８、ＣＤ９０、ＣＤ４５ｆ、ＣＤ３４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ；ＴＣＲα、ＴＣＲβ、ＴＣＲγ、及び／又はＴＣＲδの定常領域；４－１ＢＢ、ＯＸ４０、ＯＸ４０Ｌ、ＣＤ６２Ｌ、ＡＲＰ５、ＣＣＲ５、ＣＣＲ７、ＣＣＲ１０、ＣＸＣＲ３、ＣＸＣＲ４、ＣＤ９４／ＮＫＧ２、ＮＫＧ２Ａ、ＮＫＧ２Ｂ、ＮＫＧ２Ｃ、ＮＫＧ２Ｅ、ＮＫＧ２Ｈ、ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫＧ２Ｆ、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ４６、ＮＫｐ３０、ＤＮＡＭ、ＸＣＲ１、ＸＣＬ１、ＸＣＬ２、ＩＬＴ、ＬＩＲ、Ｌｙ４９、ＩＬ２Ｒ、ＩＬ７Ｒ、ＩＬ１０Ｒ、ＩＬ１２Ｒ、ＩＬ１５Ｒ、ＩＬ１８Ｒ、ＴＮＦα、ＩＦＮγ、ＴＧＦ－β、及びα５β１から選択される標的に対する結合を提供する１つ以上のターゲティングリガンドを含む、１９又は２０に記載の方法。

２４．表面コートが、骨髄細胞、造血幹細胞（ＨＳＣ）、造血幹／前駆細胞（ＨＳＰＣ）、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）、骨髄系前駆細胞、リンパ系前駆細胞、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫＴ細胞、ＮＫ細胞、樹状細胞、単球、顆粒球、赤血球、巨核細胞、マスト細胞、好塩基球、好酸球、好中球、マクロファージ、赤血球系前駆細胞、巨核細胞－赤血球系前駆細胞（ＭＥＰ）、骨髄系共通前駆細胞（ＣＭＰ）、複能性前駆細胞（ＭＰＰ）、造血幹細胞（ＨＳＣ）、短期ＨＳＣ（ＳＴ－ＨＳＣ）、ＩＴ－ＨＳＣ、長期ＨＳＣ（ＬＴ－ＨＳＣ）、内皮細胞、ニューロン、星状細胞、膵細胞、膵島β細胞、肝臓細胞、筋肉細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、肝細胞、脂肪細胞、腸細胞、結腸細胞、及び胃細胞から選択される標的細胞に対する結合を提供する１つ以上のターゲティングリガンドを含む、１９又は２０に記載の方法。

２５．送達媒体が、ペイロードへとコンジュゲートされたターゲティングリガンドであり、ターゲティングリガンドが、細胞表面タンパク質に対する結合を提供する、８から１０のいずれか１つに記載の方法。

２６．送達媒体が、帯電ポリマーであるポリペプチドドメインへとコンジュゲートされたターゲティングリガンドであり、ターゲティングリガンドが、細胞表面タンパク質に対する結合を提供し、帯電ポリマーであるポリペプチドドメインが、核酸ペイロードと共に凝縮され、及び／又はタンパク質ペイロードと静電相互作用する、８から１０のいずれか１つに記載の方法。

２７．ターゲティングリガンドが、ペプチド、ＳｃＦｖ、Ｆ（ａｂ）、核酸アプタマー、又はペプトイドである、２５又は２６に記載の方法。

２８．帯電ポリマーであるポリペプチドドメインのアミノ酸長が３～３０である、２６に記載の方法。

２９．送達媒体が、ペイロード、及び帯電ポリマーであるポリペプチドドメインと相互作用するアニオン性ポリマーをさらに含む、２６から２８のいずれか１つに記載の方法。

３０．アニオン性ポリマーが、ポリ（グルタミン酸）及びポリ（アスパラギン酸）から選択される、２９に記載の方法。

【０３１０】

３１．ターゲティングリガンドが５～５０アミノ酸長である、２５から３０のいずれか１つに記載の方法。

３２．ターゲティングリガンドが、Ｇタンパク質共役型受容体（ＧＰＣＲ）ファミリーＢ、受容体チロシンキナーゼ（ＲＴＫ）、細胞表面糖タンパク質及び細胞間接着分子から選択される細胞表面タンパク質に対する結合を提供する、２５から３１のいずれか１つに記

載の方法。
３３．ターゲティングリガンドが、狂犬病ウイルス糖タンパク質（ＲＶＧ）断片、ＡｐｏＥ－トランスフェリン、ラクトフェリン、メラノフェリチン、オボトランスフェリチン、L-セレクチン、E-セレクチン、P-セレクチン、シアル化ペプチド、ポリシアル化Ｏ結合型ペプチド、ＴＰＯ、ＥＰＯ、ＰＳＧＬ－１、ＥＳＬ－１、ＣＤ４４、死受容体３（ＤＲ３）、ＬＡＭＰ１、ＬＡＭＰ２、Ｍａｃ２－ＢＰ、幹細胞因子（ＳＣＦ）、ＣＤ７０、ＳＨ２ドメイン含有タンパク質１Ａ（ＳＨ２Ｄ１Ａ）、エキセンディン、エキセンディン－Ｓ１１Ｃ、ＧＬＰ１、ＲＧＤ、トランスフェリンリガンド、ＦＧＦ断片、α５β１リガンド、ＩＬ２、Ｃｄｅ３ε、ペプチド－ＨＬＡ－Ａ＊２４０２、ＣＤ８０、ＣＤ８６、コハク酸、ビスホスホネート、造血幹細胞走化性脂質、スフィンゴシン、セラミド、スフィンゴシン-1-リン酸、セラミド-1-リン酸、及びこれらの活性ターゲティング断片からなる群から選択される、２５から３１のいずれか１つに記載の方法。
３４．ターゲティングリガンドが、ＣＤ３、ＣＤ８、ＣＤ４、ＣＤ２８、ＣＤ９０、ＣＤ４５ｆ、ＣＤ３４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ；ＴＣＲα、ＴＣＲβ、ＴＣＲγ、及び／又はＴＣＲδの定常領域；４－１ＢＢ、ＯＸ４０、ＯＸ４０Ｌ、ＣＤ６２Ｌ、ＡＲＰ５、ＣＣＲ５、ＣＣＲ７、ＣＣＲ１０、ＣＸＣＲ３、ＣＸＣＲ４、ＣＤ９４／ＮＫＧ２、ＮＫＧ２Ａ、ＮＫＧ２Ｂ、ＮＫＧ２Ｃ、ＮＫＧ２Ｅ、ＮＫＧ２Ｈ、ＮＫＧ２Ｄ、ＮＫＧ２Ｆ、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ４６、ＮＫｐ３０、ＤＮＡＭ、ＸＣＲ１、ＸＣＬ１、ＸＣＬ２、ＩＬＴ、ＬＩＲ、Ｌｙ４９、ＩＬ２Ｒ、ＩＬ７Ｒ、ＩＬ１０Ｒ、ＩＬ１２Ｒ、ＩＬ１５Ｒ、ＩＬ１８Ｒ、ＴＮＦα、ＩＦＮγ、ＴＧＦ－β、及びα５β１から選択される標的に対する結合を提供する、２５から３１のいずれか１つに記載の方法。
３５．ターゲティングリガンドが、骨髄細胞、造血幹細胞（ＨＳＣ）、長期ＨＳＣ、短期ＨＳＣ、造血幹／前駆細胞（ＨＳＰＣ）、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）、骨髄系前駆細胞、リンパ系前駆細胞、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫＴ細胞、ＮＫ細胞、樹状細胞、単球、顆粒球、赤血球、巨核細胞、マスト細胞、好塩基球、好酸球、好中球、マクロファージ、赤血球系前駆細胞（例．ＨＵＤＥＰ細胞）、巨核細胞－赤血球系前駆細胞（ＭＥＰ）、骨髄系共通前駆細胞（ＣＭＰ）、複能性前駆細胞（ＭＰＰ）、造血幹細胞（ＨＳＣ）、短期ＨＳＣ（ＳＴ－ＨＳＣ）、ＩＴ－ＨＳＣ、長期ＨＳＣ（ＬＴ－ＨＳＣ）、内皮細胞、ニューロン、星状細胞、膵細胞、膵島β細胞、筋肉細胞、骨格筋細胞、心筋細胞、肝細胞、脂肪細胞、腸細胞、結腸細胞、及び胃細胞からなる群から選択される細胞への結合をもたらす、２５から３１のいずれか１つに記載の方法。
３６．標的細胞のゲノム内の前記２か所で二本鎖切断を生成する前の前記２か所の間隔が、１，０００，０００塩基対以下である、１から３５のいずれか１つに記載の方法。
３７．標的細胞のゲノム内の前記２か所で二本鎖切断を生成する前の前記２か所の間隔が、１００，０００塩基対以下である、１から３５のいずれか１つに記載の方法。
３８．第１及び第２のゲノム付着末端を、ＴＣＲα座位又はＴＣＲβ座位において生じさせる、１から３５のいずれか１つに記載の方法。
３９．第１及び第２のゲノム付着末端のうちの少なくとも１つを、（１）図５９に示されたＣＲＩＳＰＲ／ＣａｓガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）配列のうちの１以上を使用して、及び／又は（２）図５９に示されたＴＡＬＥＮ配列のうちの１以上をターゲティングすることにより生じさせる、１から３５のいずれか１つに記載の方法。
４０．ドナーＤＮＡが、合計１０塩基対（ｂｐ）～１００キロ塩基対（ｋｂｐ）である、１から３５のいずれか１つに記載の方法。
【０３１１】
４１．ドナーＤＮＡの挿入が、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）タンパク質をコードするヌクレオチド配列内で生じる、１から４０のいずれか１つに記載の方法。
４２．ドナーＤＮＡが、ＴＣＲタンパク質のＣＤＲ１、ＣＤＲ２又はＣＤＲ３領域のアミノ酸をコードする、４１に記載の方法。
４３．ドナーＤＮＡが、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードするヌクレオチド配列を含み、前記ドナーＤＮＡの挿入が、ＣＡＲをコードするヌクレオチド配列の内因性Ｔ細胞プ

ロモーターへの作動可能な連結をもたらす、１から４０のいずれか１つに記載の方法。
４４．ドナーＤＮＡが、プロモーターに作動可能に連結し、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）をコードするヌクレオチド配列を含む、１から４０のいずれか１つに記載の方法。
４５．ドナーＤＮＡが、膜に結合し細胞外に提示される細胞特異的ターゲティングリガンドをコードするヌクレオチド配列を含み、前記ドナーＤＮＡの挿入が、細胞特異的ターゲティングリガンドをコードするヌクレオチド配列の内因性プロモーターへの作動可能な連結をもたらす、１から４０のいずれか１つに記載の方法。
４６．ドナーＤＮＡが、膜に結合し細胞外に提示される細胞特異的ターゲティングリガンドをコードする配列に作動可能に連結するプロモーターを含む、１から４０のいずれか１つに記載の方法。
４７．方法が、
標的細胞のゲノム内の４か所にで付着末端を伴う二本鎖切断を生成し、これにより、第１及び第２のゲノム付着末端に加えて、第３のゲノム付着末端及び第４のゲノム付着末端を生じさせること；並びに
各々が、各末端に５’又は３’突出を有する２つの直鎖状の二本鎖ドナーＤＮＡを導入すること
を含み、
１つのドナーＤＮＡの末端が第１及び第２のゲノム付着末端とハイブリダイズし、他のドナーＤＮＡの末端が第３及び第４のゲノム付着末端とハイブリダイズし、
これにより、前記２つのドナーＤＮＡの、標的細胞のゲノムへの挿入をもたらす、１から４０のいずれか１つに記載の方法。
４８．（１）１つのドナーＤＮＡの挿入が、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α若しくはδサブユニットをコードするヌクレオチド配列内で生じ、他のドナーＤＮＡの挿入が、ＴＣＲβ若しくはγサブユニットをコードするヌクレオチド配列内で生じるか；又は
（２）１つのドナーＤＮＡの挿入が、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α若しくはγサブユニットをコードするヌクレオチド配列内で生じ、他のドナーＤＮＡの挿入が、ＴＣＲβ若しくはδサブユニットをコードするヌクレオチド配列内で生じるか；又は
（３）１つのドナーＤＮＡの挿入が、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、若しくはＩｇＭタンパク質のκ鎖をコードするヌクレオチド配列内で生じ、他のドナーＤＮＡの挿入が、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、若しくはＩｇＭタンパク質のλ鎖をコードするヌクレオチド配列内で生じる、
４７に記載の方法。
４９．１つのドナーＤＮＡの挿入が、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α又はδサブユニットの定常領域をコードするヌクレオチド配列内で生じ、他のドナーＤＮＡの挿入が、ＴＣＲβ又はγサブユニットの定常領域をコードするヌクレオチド配列内で生じる、４７に記載の方法。
５０．（１）１つのドナーＤＮＡの挿入が、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α若しくはδサブユニットのプロモーターとして機能するヌクレオチド配列内で生じ、他のドナーＤＮＡの挿入が、ＴＣＲβ若しくはγサブユニットのプロモーターとして機能するヌクレオチド配列内で生じるか；又は
（２）１つのドナーＤＮＡの挿入が、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α若しくはγサブユニットのプロモーターとして機能するヌクレオチド配列内で生じ、他のドナーＤＮＡの挿入が、ＴＣＲβ若しくはδサブユニットのプロモーターとして機能するヌクレオチド配列内で生じるか；又は
（３）１つのドナーＤＮＡの挿入が、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、若しくはＩｇＭタンパク質のκ鎖のプロモーターとして機能するヌクレオチド配列内で生じ、他のドナーＤＮＡの挿入が、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、若しくはＩｇＭタンパク質のλ鎖のプロモーターとして機能するヌクレオチド配列内で生じる、
４７に記載の方法。
【０３１２】

５１．前記ドナーＤＮＡの挿入が、挿入されたドナーＤＮＡの、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α、β、γ、又はδの内因性プロモーターとの作動可能な連結をもたらす、１から５０のいずれか１つに記載の方法。
５２．ドナーＤＮＡが、ＴＣＲα、β、γ、又はδのプロモーターに作動可能に連結するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、１から５０のいずれか１つに記載の方法。
５３．前記ドナーＤＮＡの挿入が、挿入されたドナーＤＮＡの、（ｉ）Ｔ細胞特異的プロモーター；（ｉｉ）ＣＤ３プロモーター；（ｉｉｉ）ＣＤ２８プロモーター；（ｉｖ）幹細胞特異的プロモーター；（ｖ）体細胞特異的プロモーター；（ｖｉ）Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）α、β、γ、又はδのプロモーター；（ｖ）Ｂ細胞特異的プロモーター；（ｖｉ）ＣＤ１９プロモーター；（ｖｉｉ）ＣＤ２０プロモーター；（ｖｉｉｉ）ＣＤ２２プロモーター；（ｉｘ）Ｂ２９プロモーター；及び（ｘ）Ｔ細胞又はＢ細胞のＶ（Ｄ）Ｊ特異的プロモーターからなる群から選択されるプロモーターとの作動可能な連結をもたらす、１から５０のいずれか１つに記載の方法。
５４．ドナーＤＮＡが、Ｔ細胞特異的プロモーターに作動可能に連結するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、１から５０のいずれか１つに記載の方法。
５５．ドナーＤＮＡが、プロモーターに作動可能に連結するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、１から５０のいずれか１つに記載の方法。
５６．前記ドナーＤＮＡの挿入が、挿入されたドナーＤＮＡの幹細胞又は体細胞特異的な内因性プロモーターとの作動可能な連結をもたらす、１から５０のいずれか１つに記載の方法。
５７．ドナーＤＮＡが、（例えば、遺伝子編集効率を評価するための、）レポータータンパク質（例えば、近赤外及び／又は遠赤色レポータータンパク質）をコードするヌクレオチド配列を含む、１から５６のいずれか１つに記載の方法。
５８．前記ドナーＤＮＡの挿入が、挿入されたドナーＤＮＡの内因性プロモーターとの作動可能な連結をもたらす、５７に記載の方法。
５９．ドナーＤＮＡが、レポータータンパク質をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結するプロモーターを含む、５７に記載の方法。
６０．ドナーＤＮＡが、（ｉ）Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）タンパク質；（ｉｉ）ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、若しくはＩｇＭタンパク質；又は（ｉｉｉ）ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、若しくはＩｇＭタンパク質のκ若しくはλ鎖をコードするヌクレオチド配列を含む、１から５９のいずれか１つに記載の方法。
【０３１３】
６１．ドナーＤＮＡが、イントロンを有さないタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、１から６０のいずれか１つに記載の方法。
６２．イントロンを有さないヌクレオチド配列が、ＴＣＲタンパク質又は免疫グロブリンの、全体又は一部分をコードする、６１に記載の方法。
６３．ドナーＤＮＡが、少なくとも１つのアデニル化３’末端を有する、１から６２のいずれか１つに記載の方法。
６４．標的細胞が、哺乳動物細胞である、１から６３のいずれか１つに記載の方法。
６５．標的細胞が、ヒト細胞である、１から６４のいずれか１つに記載の方法。
６６．（ａ）各末端に５’突出又は３’突出を有する直鎖状の二本鎖ドナーＤＮＡ；及び
（ｂ）配列特異的ヌクレアーゼ又は配列特異的ヌクレアーゼをコードする核酸
を含み、
（ａ）及び（ｂ）が、同じ送達媒体の一部としてのペイロードである、
キット又は組成物。
６７．送達媒体が、ナノ粒子である、６６に記載のキット又は組成物。
６８．ナノ粒子が、（ａ）、（ｂ）、アニオン性ポリマー組成物、カチオン性ポリマー組成物、及びカチオン性ポリペプチド組成物を含むコアを含む、６７に記載のキット又は組

成物。
６９．ナノ粒子が、ナノ粒子を細胞表面タンパク質にターゲティングするターゲティングリガンドを含む、６７又は６８に記載のキット又は組成物。
７０．直鎖状二本鎖内ドナーと配列特異的ヌクレアーゼが互いに結合して、デオキシリボヌクレオタンパク質又はリボ－デオキシリボヌクレオタンパク質複合体を形成する、６６から６９のいずれか１つに記載のキット又は組成物。
【０３１４】
７１．送達媒体が、帯電ポリマーであるポリペプチドドメインへとコンジュゲートされたターゲティングリガンドであり、ターゲティングリガンドが、細胞表面タンパク質に対する結合を提供し、帯電ポリマーであるポリペプチドドメインがペイロードと静電相互作用する、６６から７０のいずれか１つに記載のキット又は組成物。
７２．送達媒体が、ペイロード、及び帯電ポリマーであるポリペプチドドメインと相互作用するアニオン性ポリマーをさらに含む、７１に記載のキット又は組成物。
７３．送達媒体が、（ａ）及び／又は（ｂ）とコンジュゲートしたターゲティングリガンドであり、ターゲティングリガンドが、細胞表面タンパク質に対する結合を提供する、６６から７０のいずれか１つに記載のキット又は組成物。
７４．細胞表面タンパク質が、ＣＤ４７である、６９から７３のいずれか１つに記載のキット又は組成物。
７５．ターゲティングリガンドが、ＳＩＲＰαタンパク質模倣体である、７４に記載のキット又は組成物。
７６．送達媒体が、エンドサイトーシス誘発性リガンドをさらに含む、６９から７５のいずれか１つに記載のキット又は組成物。
７７．送達媒体が、水中油中水エマルジョン粒子、水中油エマルジョンミセル粒子、多重膜型水中油中水エマルジョン粒子、多層型粒子又はＤＮＡオリガミナノボットをコーティングする、ターゲティングリガンドを含む、６６から７０のいずれか１つに記載のキット又は組成物。
７８．ターゲティングリガンドが、ペプチド、ＳｃＦｖ、Ｆ（ａｂ）、核酸アプタマー、又はペプトイドである、６９から７４のいずれか１つに記載の方法。
７９．送達媒体が、非ウイルス性である、６６から７０のいずれか１つに記載のキット又は組成物。
【実施例】
【０３１５】
実験
以下の例は、当業者に、本発明を、どのようにして作り、使用するのかについての、完全な開示及び記載をもたらすように明示されるものであり、本発明の範囲を限定するように意図されるものでも、下記の実験が、全ての実験であるか又は実施された実験だけを表すように意図されるものでもない。使用される数（例．量、温度など）に関しては、精度を確保するように努力が払われたが、一部の実験の誤差及び偏差については、考慮に入れるべきである。そうでないことが指し示されない限り、部は重量による部分であり、分子量は重量による平均分子量であり、温度は摂氏であり、圧力は大気圧であるか又はこの近傍である。
【０３１６】
本明細書で引用される全ての刊行物及び特許出願は、各個別の刊行物又は特許出願が参照により組み込まれるように、具体的かつ個別に指し示された場合と同様に、参照により本明細書に組み込まれる。
【０３１７】
本発明は、本発明を実施するのに好ましい方式を含むことが見出されるか又は提起される特定の態様との関係で記載されている。本発明の範囲から逸脱しない限りにおいて、例示される特定の態様では、本明細書に照らして、多数の改変及び変化がなされうることが当業者により理解されるであろう。例えば、コドンの冗長性のために、タンパク質配列に

影響を及ぼさずに根底をなすＤＮＡ配列内に変化が施されうる。さらに、生物学的な機能的同等性を考慮するために、種類又は量において、生物学的作用に影響を及ぼさずにタンパク質構造に変化が施されうる。全てのこのような改変は、特許請求の範囲内に含まれることが意図される。

【０３１８】

実施例１　（図１０～２９）

実施例２　（図３０～３４）

【０３１９】

実施例３　（図３５～５５）

本発明者らは、フローサイトメトリー及び高含量スクリーニングにより細胞への取込みと表現型を特徴付け、さまざまな細胞で送達効率及び遺伝子編集を定量する。

【０３２０】

これらの実験では、非刺激ヒト初代汎Ｔ細胞（ＣＤ４＋及びＣＤ８＋ Ｔ細胞の混合物）及び末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）をフラッシュトランスフェクト（ナノ粒子を伴う、３０分間にわたるインキュベーション）し、１０ｕｇ／ｍｌの硫酸ヘパランを含有するＰＢＳで２回洗浄し、２４時間後にAttune NxTフローサイトメーター上で解析した。ＣＤ４及びＣＤ８に特異的な抗体で細胞を染色し、各部分集団内でＥＧＦＰタグ付けＣａｓ９の導入を定量した。

【０３２１】

実施例４　（図５６～５７）

マルチモードのデータセット

フローサイトメトリー及び高含量スクリーニングにより、細胞への取込みと表現型を特徴付け、さまざまな細胞で送達効率及び遺伝子編集を定量した。

【０３２２】

これらの実験では、非刺激ヒト初代汎Ｔ細胞（ＣＤ４＋及びＣＤ８＋ Ｔ細胞の混合物）及び末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）に、フラッシュトランスフェクトし（ナノ粒子と共に３０分間インキュベーション）、１０ｕｇ／ｍｌの硫酸ヘパランを含有するＰＢＳで２回洗浄し、２４時間後にAttune NxTフローサイトメーターで解析した。細胞を、ＣＤ４及びＣＤ８特異的抗体で染色し、ＥＧＦＰタグ付けＣａｓ９の導入を各集団内で定量した。以下の表は、トランスフェクションの１時間後に実施した４０倍の対物レンズ付きBioTek Cytation 5 Imaging Readerによる画像の、２４時間後のフローサイトメトリーデータとの比較を示す。特定の理論に束縛されることを意図せずに述べると、２４時間以上後に細胞への内在化が決まるのに対し、初期では、細胞との親和性が決まると考えられる。細胞との親和性を１時間後の画像から決定するために、教師なし学習を用い、画像データをフローサイトメトリーで評価した２４時間後の細胞への取込みと比較した。

【０３２３】

実施例５　（図６０～６６）

２０Ｍの汎Ｔ細胞（IQ Biosciences）を、２０ｍＬの培地を含有するフラスコ中で融解した。翌日、ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズ（１０Ｍのビーズ）を非刺激細胞に導入した。融解及び再懸濁の２日後、細胞をペレット化し培地を交換した。融解及び再懸濁の３日後、ビーズを除去した。

【０３２４】

ヌクレオフェクションのために、１６０ｐｍｏｌのｓｇＲＮＡ及び１２６ｐｍｏｌのＣｐｆ１（Ａ．ｓ．又はＬ．ｂ．）を、以下の例のとおりに利用した：

【０３２５】

【表２】

	μM (pmol/μL)	160pmol sgRNA	126pmol A.s. Cpf1	PBS	126pmol L.b. Cpf1	PBS
LL001 0.1%	70.42	2.2720817949	2	0.7279182051	1.26	1.4679182051
LL002 0.1%	77.52	2.0639834881	2	0.9360165119	1.26	1.6760165119
LL003 0.1%	69.93	2.288002288	2	0.711997712	1.26	1.451997712
LL032 0.1%	76.92	2.0800832033	2	0.9199167967	1.26	1.6599167967
Cpf1 pos control 0.1%	75.1	2.13	2	0.87	1.26	1.61
	μM (pmol/μL)	160pmol sgRNA	*3	126pmol A.s. Cpf1 v3	PBS	
LL002 0.1%	77.52	2.0639834881	6.1919504644	6	2.8080495356	
LL003 0.1%	69.93	2.288002288	6.864006864	6	2.135993136	
LL032 0.1%	76.92	2.0800832033	6.24024961	6	2.75975039	

【０３２６】

低温保存されたヒト初代Ｔ細胞を融解し、ＣＤ３／ＣＤ２８ビーズと共に培養した翌日から２日間刺激した。ＴＲＢＣ１／Ｃ２座位の二本鎖切断Ｃｐｆ１媒介型編集と、その後のＧＦＰをコードする付着末端を伴うドナーＤＮＡ鋳型を介した挿入後、細胞の１．２７％がＧＦＰ＋であった。ビーズを除去した翌日、Lonza Amaxa 4Dシステム、Ｐ３初代細胞キットを用いて、細胞を電気穿孔した。ＲＮＰは、６４ｐｍｏｌのＡ．ｓ．Ｃｐｆ１（ＩＤＴ、型番：1081068）及び１２８ｐｍｏｌのｓｇＲＮＡ（ＩＤＴ）を室温で１０～２０分間インキュベートすることにより形成し、次いで、４μｇのｄｓＤＮＡインサート又はＩＤＴ製のＣｐｆ１電気穿孔増強剤（型番：1076301）に添加し、１０分間インキュベートした。２０μＬ中の刺激Ｔ細胞１×１０^{6}個を添加し、次いで、キュベットに移し、ＥＨ－１１５（Ｂ、ＲＮＰ単独）又はＥＯ－１１５（Ｃ、ＲＮＰ＋ＤＮＡ）のパルスで電気穿孔した（図６２）。ヌクレオフェクション後７日目に、ＴＣＲａ／ｂ及びＧＦＰの発現について、フローサイトメトリーによりアッセイした。図は、生細胞集団内の細胞（アネキシン／Sytox陰性）を示す。QuickExtract（Lucigen）を使用して細胞からＤＮＡを回収した。

【０３２７】

ＴＲＢＣ１／ＴＲＢＣ２座位の両者を切断し４ｂｐの突出を伴う二本鎖切断を形成する二本鎖切断Ｃｐｆ１研究における多様なプライマー（ＴＲＢＣ１－ＴＲＢＣ２、ＧＦＰ－ＧＦＰ、及びＧＦＰ－ＴＲＢＣ２）の比較は、弱いバンドをもたらした。突出は、ＧＦＰインサート配列又はＦＬＡＧインサート配列とマッチさせたもので、フローサイトメトリー及びＰＣＲ（ＧＦＰ対Ｃｐｆ１　ＲＮＰのみ）、又はサンガーシーケンシング（ＦＬＡＧ対Ｃｐｆ１　ＲＮＰのみ）によって確認した。

【０３２８】

【表３】

名称	核酸の型	説明	配列
LL001	sgRNA	TRAC エキソン1 Cpf1 ガイド	TAATTTCTACTCTTGTAGATCATGTGCAAACGCCTTCAACAACA
LL002	sgRNA	TRAC エキソン1 Cpf1 ガイド	TAATTTCTACTCTTGTAGATCATGTGCAAACGCCTTCAAC
LL003	sgRNA	TRB1 エキソン1 Cpf1 ガイド - C1及びC2	TAATTTCTACTCTTGTAGATGGTGTGGGAGATCTCTGCTTCTGA
LL004	sgRNA	TRB プロモーター Cpf1 ガイド	TAATTTCTACTCTTGTAGATCAGATGGGCTGAAGTCTCCACTGT
LL032		TRAC エキソン1 Cpf1 ガイド	TAATTTCTACTCTTGTAGATTTTGAGAATCAAAATCGGTG

【０３２９】

表は、ＴＲＡＣ、ＴＲＢ１　Ｃ１／Ｃ２及びＴＲＢのプロモーター領域に使用されるｓｇＲＮＡ配列を示す。

【０３３０】

【表４－１】

LL300	ssDNA	LL001 Flag テトリスト゛ナー アンチセンス - ホスホ LL301 でアニール	GTTGcttatcgtcatcgtctttgtaatc
LL301	ssDNA	LL001 Flag テトリスト゛ナー センス - ホスホ LL300 でアニール	CAACgattacaaagacgatgacgataag
LL302	ssDNA	LL003 Flag テトリスト゛ナー アンチセンス - ホスホ LL303 でアニール	TCTGcttatcgtcatcgtctttgtaatc
LL303	ssDNA	LL003 Flag テトリスト゛ナー センス - ホスホ LL302 でアニール	CAGAgattacaaagacgatgacgataag
LL304	ssDNA	LL032 Flag テトリスト゛ナー アンチセンス - ホスホ LL305 でアニール	GAATcttatcgtcatcgtctttgtaatc
LLテトリス GFP	ssDNA	LL003 GFP テトリスト゛ナー センス - ホスホ アンチセンスでアニール	Ggctccggcgagggcaggggaagtctactaacatgcggggacgtggaggaaaatcccggcccaagcaaaggagaagaacttttcactggagttgtcccaattcttgttgaattagatggtgatgttaatgggcacaaattttctgtccgtggagagggtgaaggtgatgctacaaacggaaaactcacccttaaatttatttgcactactggaaaactacctgttccgtggccaacacttgtcactactctgacctatggtgttcaatgcttttcccgttatccggatcacatgaaacggcatgacttttcaagagtgccatgcccgaaggttatgtacaggaacgcactatatctttcaaagatgacgggacctacaagacgcgtgctgaagtcaagtttgaaggtgatacccttgttaatcgtatcgagttaaagggtattgattttaaagaagatggaaacattcttggacacaaactcgagtacaactttaactcacacaatgtatacatcacggcagacaaacaaaagaatggaatcaaagctaacttcaaaattcgccacaacgttgaagatggttccgttcaactagcagaccattatcaacaaaatactccaattggcgatggccctgtccttttaccagacaaccattacctgtcgacacaatctgtccttttcgaaagatcccaacgaaaagcgtgaccacatggtccttcttgagtttgtaactgctgctgggattacacatggcatggatgagctctacaaa

【０３３１】

【表４－２】

LLﾃﾄﾘｽ sGFP	ssDNA	LL003 GFP ﾃﾄﾘｽﾄﾞﾅｰ ｱﾝﾁｾﾝｽ - ﾎｽﾎ ｾﾝｽでｱﾆｰﾙ	CAGAtttgtagagctcatccatgccatgtgtaatcccagcagcagttacaaactcaagaaggaccatgtggtcacgcttttcgttgggatctttcgaaaggacagattgtgtcgacaggtaatggttgtctggtaaaaggacagggccatcgccaattggagtattttgttgataatggtctgctagttgaacggaaccatcttcaacgttgtggcgaattttgaagttagctttgattccattcttttgtttgtctgccgtgatgtatacattgtgtgagttaaagttgtactcgagtttgtgtccaagaatgtttccatcttctttaaaatcaataccctttaactcgatacgattaacaagggtatcaccttcaaacttgacttcagcacgcgtcttgtaggtcccgtcatctttgaaagatatagtgcgttcctgtacataaccttcgggcatggcactcttgaaaaagtcatgccgtttcatgtgatccggataacgggaaaagcattgaacaccataggtcagagtagtgacaagtgttggccacggaacaggtagttttccagtagtgcaaataaatttaagggtgagttttccgtttgtagcatcaccttcaccctctccacggacagaaaatttgtgcccattaacatcaccatctaattcaacaagaattgggacaactccagtgaaaagttcttctcctttgcttgggccgggatttcctccacgtccccgcatgttagtagacttcccctgccctcgccggagcc
LL305	ssDNA	LL032 Flag ﾃﾄﾘｽﾄﾞﾅｰ ｾﾝｽ - ﾎｽﾎ LL304でｱﾆｰﾙ	ATTCgattacaaagacgatgacgataag
LL306	ｵﾘｺﾞﾏｰ (ﾌﾟﾗｲﾏｰ)	LL001 T2A ﾃﾄﾘｽﾄﾞﾅｰ BsaI F - LL307でPCRを行いBsaIで切断	atGGTCTCACAACggctccggcgagggcagggg
LL307	ｵﾘｺﾞﾏｰ (ﾌﾟﾗｲﾏｰ)	LL001 sfGFP ﾃﾄﾘｽﾄﾞﾅｰ BsaI R - LL306でPCRを行いBsaIで切断	atGGTCTCACAACTTAtttgtagagctcatcca
LL308	ｵﾘｺﾞﾏｰ (ﾌﾟﾗｲﾏｰ)	LL003 T2A ﾃﾄﾘｽﾄﾞﾅｰ BsaI F - LL309でPCRを行いBsaIで切断	atGGTCTCACAGAggctccggcgagggcagggg
LL309	ｵﾘｺﾞﾏｰ (ﾌﾟﾗｲﾏｰ)	LL003 sfGFP ﾃﾄﾘｽﾄﾞﾅｰ BsaI R - LL308でPCRを行いBsaIで切断	atGGTCTCACAGATTAtttgtagagctcatcca

【０３３２】

【表４－３】

LL310	ｵﾘｺﾞﾏｰ (ﾌﾟﾗｲﾏｰ)	LL032 T2A ﾃﾄﾘｽﾄﾞﾅｰ BsaI F - LL311でPCRを行いBsaIで切断	atGGTCTCAATTCggctccggcgagggcagggg
LL311	ｵﾘｺﾞﾏｰ (ﾌﾟﾗｲﾏｰ)	LL032 sfGFP ﾃﾄﾘｽﾄﾞﾅｰ BsaI R - LL310でPCRを行いBsaIで切断	atGGTCTCAATTCTTAtttgtagagctcatcca

【０３３３】

【表５】

LL238	ｵﾘｺﾞﾏｰ(ﾌﾟﾗｲﾏｰ)	TRBC1&2 ﾌﾟﾗｲﾏｰ R	AGCCCGTAGAACTGGACTTGAC
LL239	ｵﾘｺﾞﾏｰ(ﾌﾟﾗｲﾏｰ)	TRBC2 ﾌﾟﾗｲﾏｰ F	GGCAAGGAAGGGGTAGAACCAT

【０３３４】

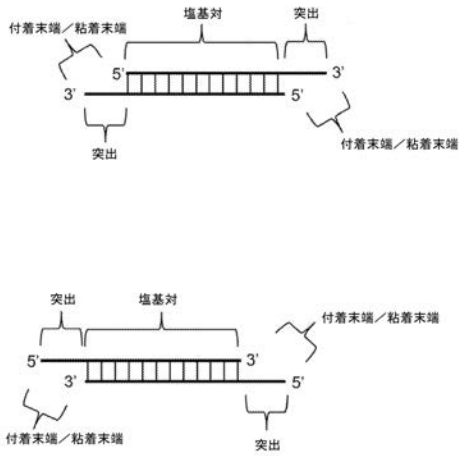
【表６】

LL030	ssDNA	TRAC エキソン1 ダブル cpf1 テトリストナー センス - LL031でアニール	AttcggctccggcgagggcaggggaagtctactaacatgcggggacgtggaggaaaatcccggcccaagcaaaggagaagaacttttcactggagttgtcccaattcttgttgaattagatggtgatgttaatgggcacaaattttctgtccgtggagagggtgaaggtgatgctacaaacggaaaactcacccttaaatttatttgcactactggaaaactacctgttccgtggccaacacttgtcactactctgacctatggtgttcaatgcttttcccgttatccggatcacatgaaacggcatgacttttttcaagagtgccatgcccgaaggttatgtacaggaacgcactatatctttcaaagatgacgggacctacaagacgcgtgctgaagtcaagttttgaaggtgatacccttgttaatcgtatcgagttaaagggtattgattttaaagaagatggaaacattcttggacacaaactcgagtacaactttaactcacacaatgtatacatcacggcagacaaacaaaagaatggaatcaaagctaacttcaaaattcgccacaacgttgaagatggttccgttcaactagcagaccattatcaacaaaatactccaattggcgatggccctgtccttttaccagacaaccattacctgtcgacacaatctgtcctttcgaaagatcccaacgaaaagcgtgaccacatggtccttcttgagtttgtaactgctgctgggattacacatggcatggatgagctctacaaaTAATAG
LL031	ssDNA	TRAC エキソン1 ダブル cpf1 テトリストナー アンチセンス - LL030でアニール	gttgCTATTAtttgtagagctcatccatgccatgtgtaatcccagcagcagttacaaactcaagaaggaccatgtggtcacgcttttcgttgggatctttcgaaaggacagattgtgtcgacaggtaatggttgtctggtaaaaggacaggggccatcgccaattggagtattttgttgataatggtctgctagttgaacggaaccatcttcaacgttgtggcgaattttgaagttagctttgattccattcttttgtttgtctgccgtgatgtatacattgtgtgagttaaagttgtactcgagtttgtgtccaagaatgtttccatcttctttaaaatcaataccctttaactcgatacgattaacaagggtatcaccttcaaacttgacttcagcacgcgtcttgtaggtcccgtcatcttttgaaagatatagtgcgttcctgtacataaccttcgggcatggcactcttgaaaaagtcatgccgtttcatgtgatccggataacgggaaaagcattgaaccaccataggtcagagtagtgacaagtgttggccacggaacaggtagttttccagtagtgcaaataaatttaagggtgagttttccgtttgtagcatcaccttcaccctctccacggacagaaaatttgtgcccattaacatcaccatctaattcaacaagaattgggacaactccagtgaaaagttcttctcctttgcttgggccggatttttcctccacgtccccgcatgttagtagacttcccctgccctcgccggagcc

10 20 30 40

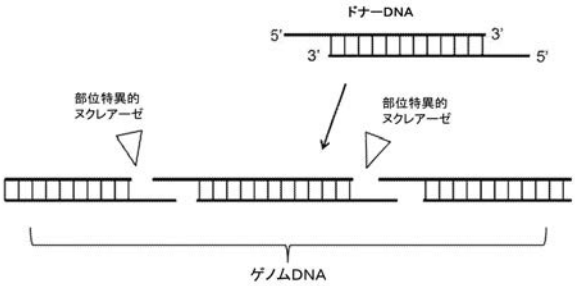
【図１】

Figure 1



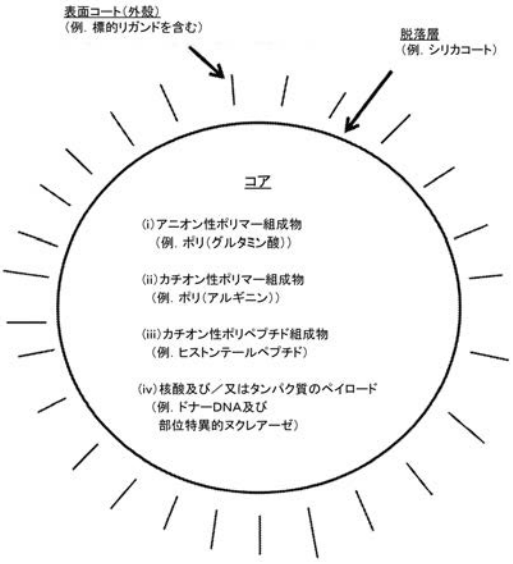
【図２】

Figure 2



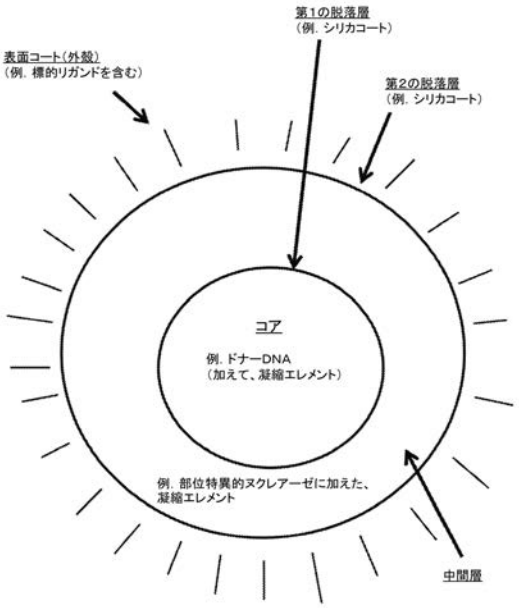
【図３】

Figure 3

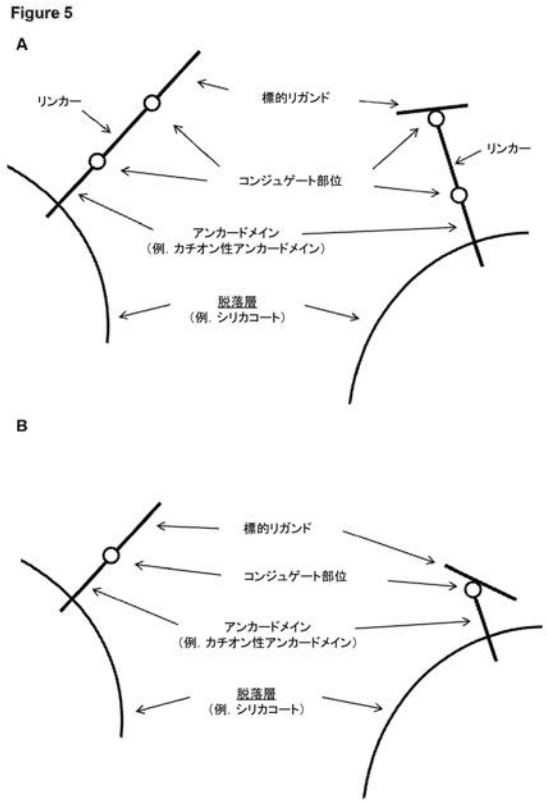


【図４】

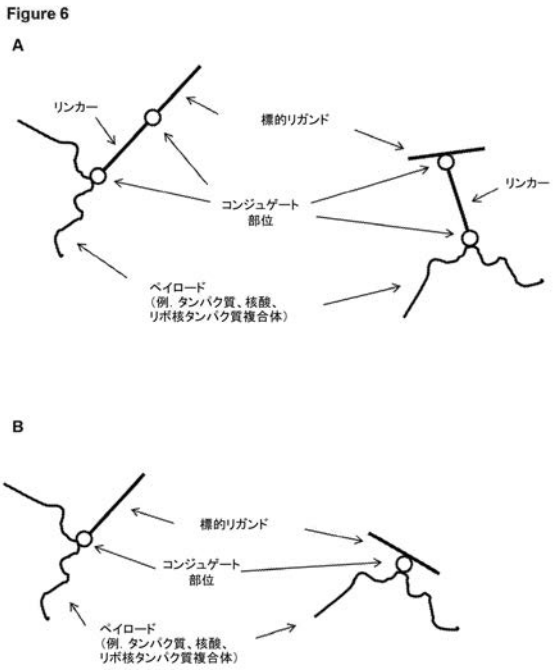
Figure 4



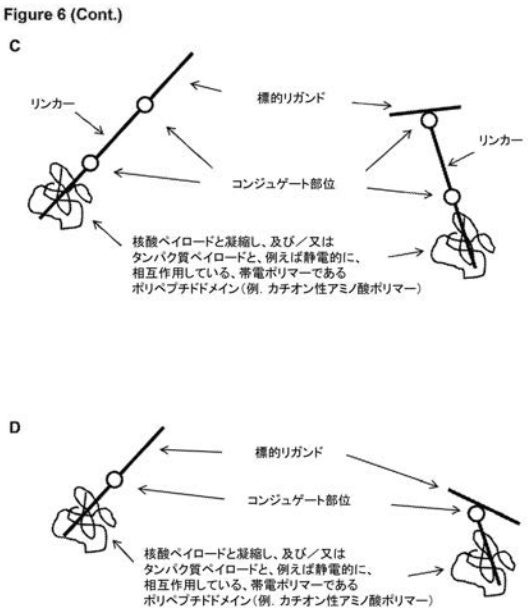
【図５】



【図６－１】



【図６－２】



【図７】

Figure 7

クラス1

LPKKRKFSEISS
KRKRWENDIP
KRKRWENNIP
TGGVMKRKRGSV
PILPLKRRRGSP
TYSGVKRKRNVV
THIGYKRKRDSV
LSGTKRKRAYFI
QRRLLKRKRGSL
QIGKKRKRDYLD
KRGKRKRLVRPW
KKGKRKRLVRPW
PSRKRKRESDHI
PSRKRKRDHYAV
ISRKRKRDLEFV
ITRKRKRDLVFT
EPNPRKRKRSEL
TSPSRKRKWDQV
TLERKRKLAVLY
RRRKRRREWEDF
HRYCGKRRRRTR

クラス2

SVLGKRSRTWE
YGRVSKRPRYQF
RKRGRKRFRSV

クラス4

KRKYAVFLESQN
KRKYSIYLGSQS
KRKWMAFVMGDP
KRKCAVFLEGQN
IPRKRSFAELYD
RLTPRKRAFSEV

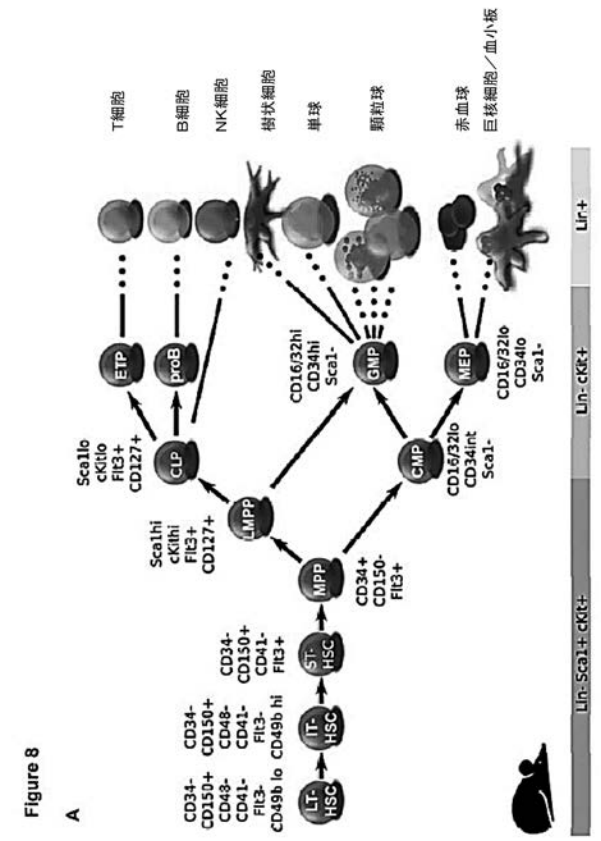
クラス3

KRSWSMAFC
KRTWAQAFTE
KRPYSIAFPLGQ
RRRSVLKRSWSVAF
KRRYSDAFRLPV
KRKYSDAFGLPV
IGRKRGYSVAFG
IGRKRVWAVAFY
WAGRKRTWRDAF
SSHRKRKFSDAF
PSHRKRKFSDAF
TAHRKRKFSDAF
RVQRKRKWSEAF
RLTRKRKYDCAF
LVNRKRRYWEAF

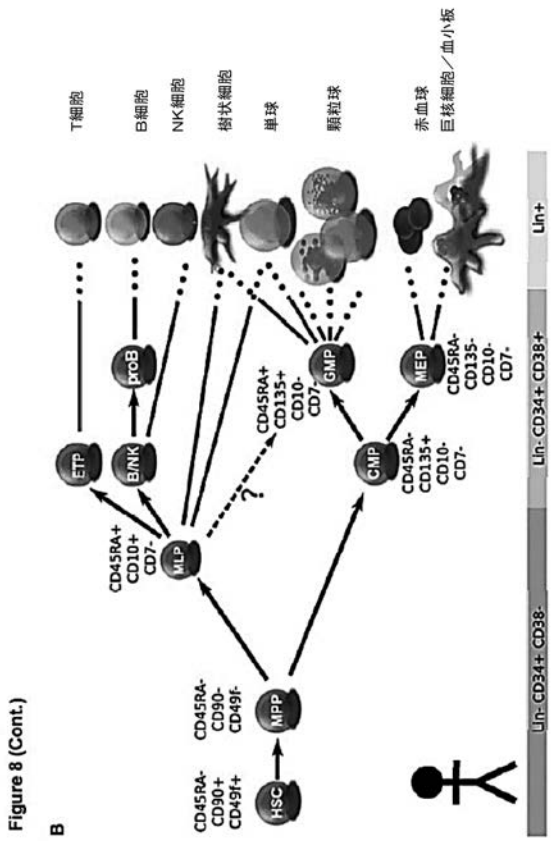
クラス5

LGKRYDRDWDYK
RSSGILGKRKFE
VHKTVLGKRKYW
SILGKRKNRDPS
QSVLGKRKSRPF
TVHLGKRRLRPW
RVLGKRKTGRSP
VLGKRKRDDCW
HGRQVLGKRKR
SVLGKRKRHPKV
SVLGKRKRHHLD
PVLGKRKRSLSS
RVLGKRKREDRP
ILGKRKRSHHPY
PILGKRKRHLFL
LLGKRKRPSIEH
SMLGKRKRCIIS
TLGKRKRISCVT
DTRLGKRKRRPW

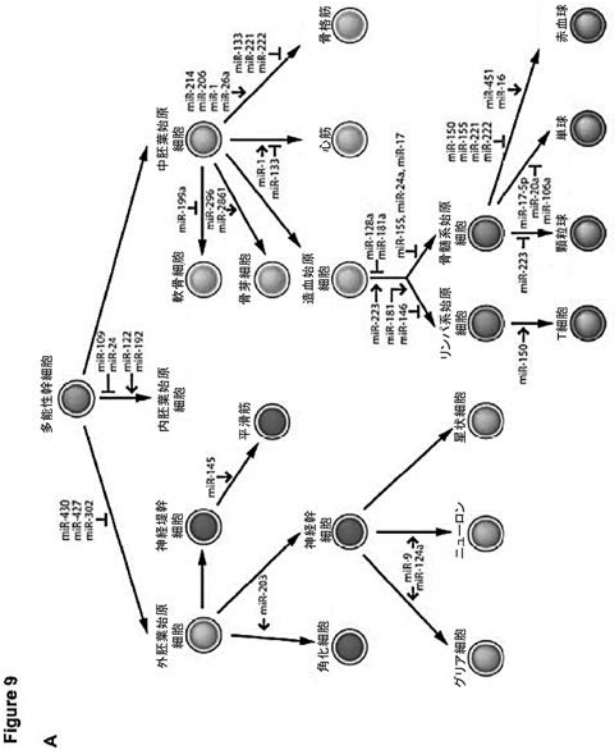
【図８－１】



【図８－２】



【図９－１】



【図９－２】

【図１０】

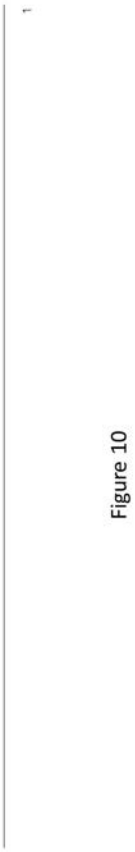


Figure 10

【図１１】



Figure 11

【図１２】

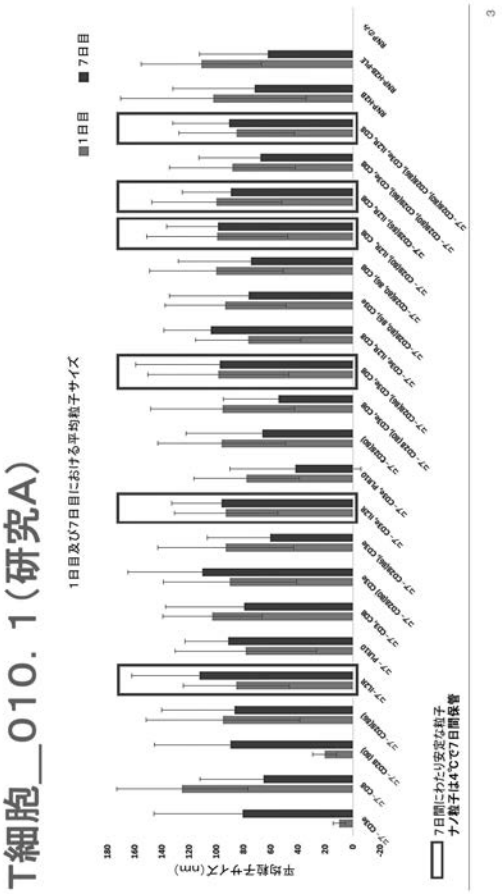


Figure 12

【図１３】

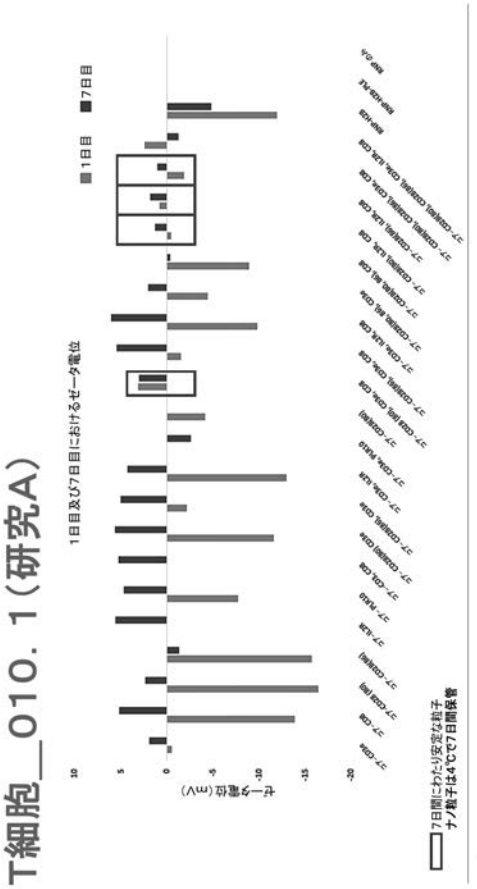


Figure 13

【図１４】

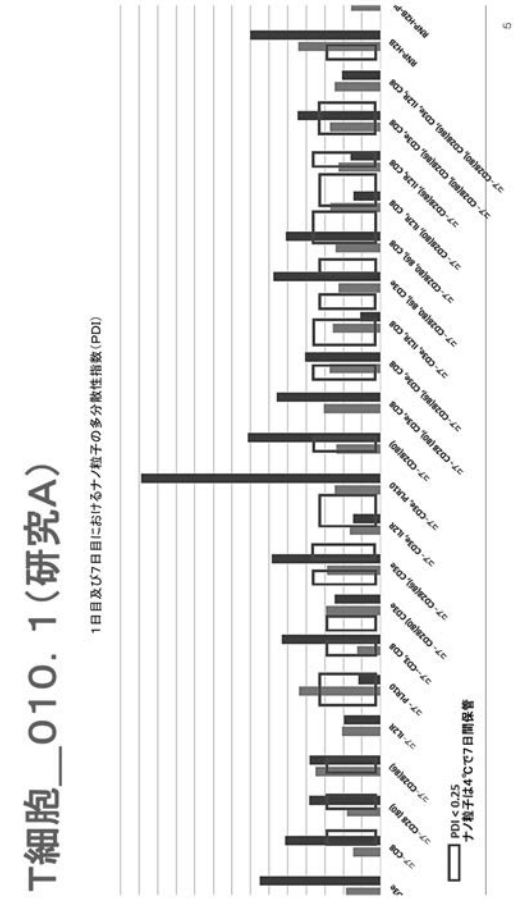


Figure 14

【図１５】

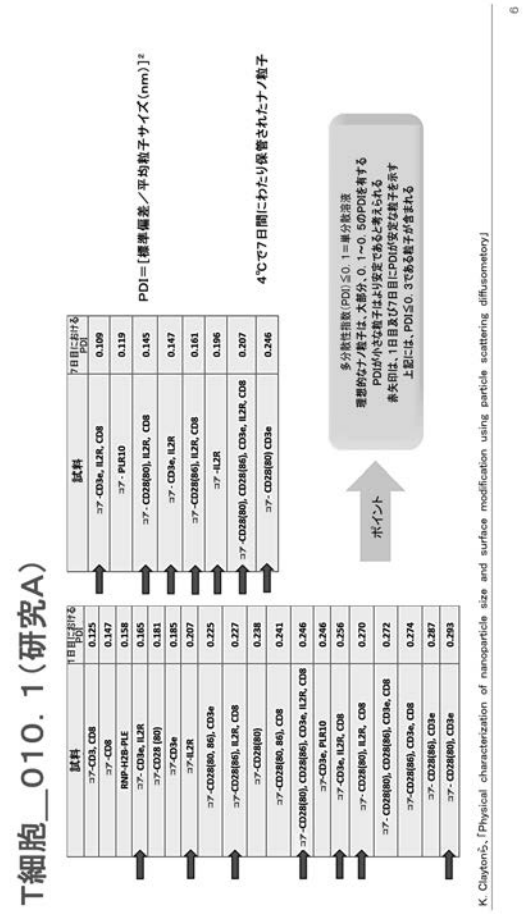


Figure 15

【図１６】

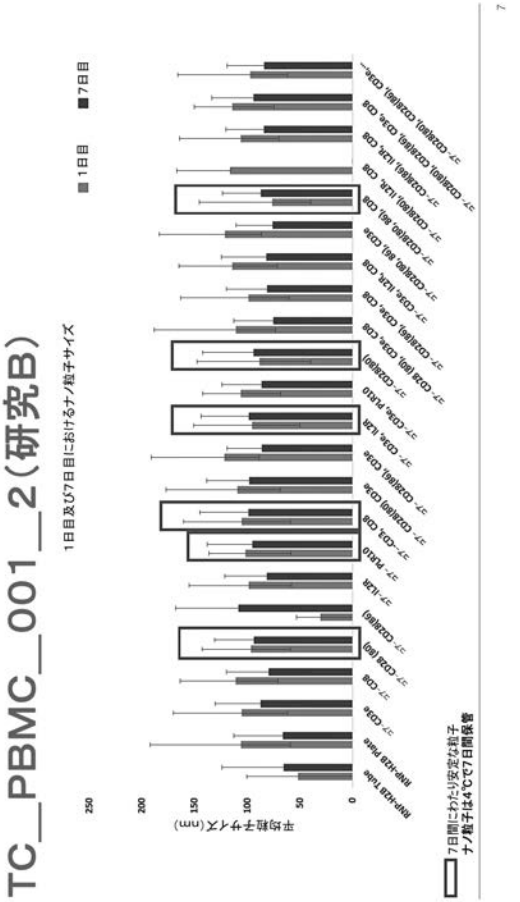


Figure 16

【図１７】

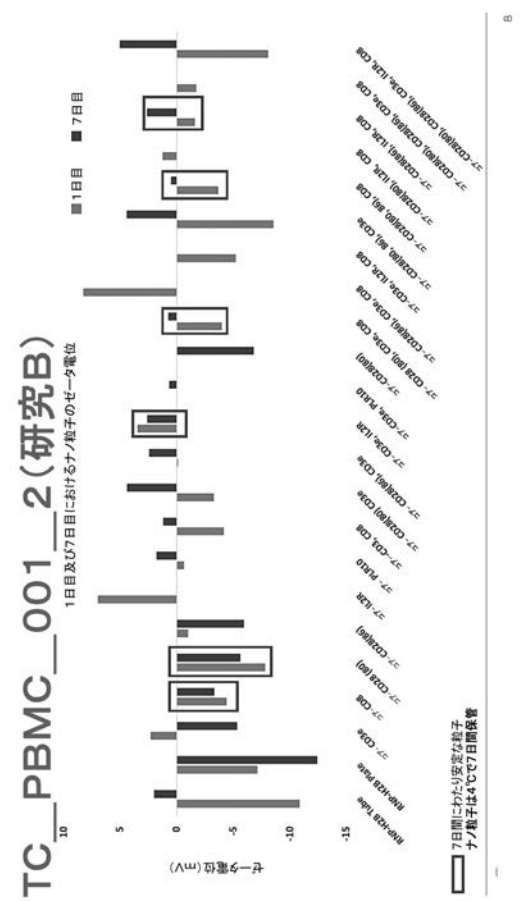


Figure 17

【図１８】

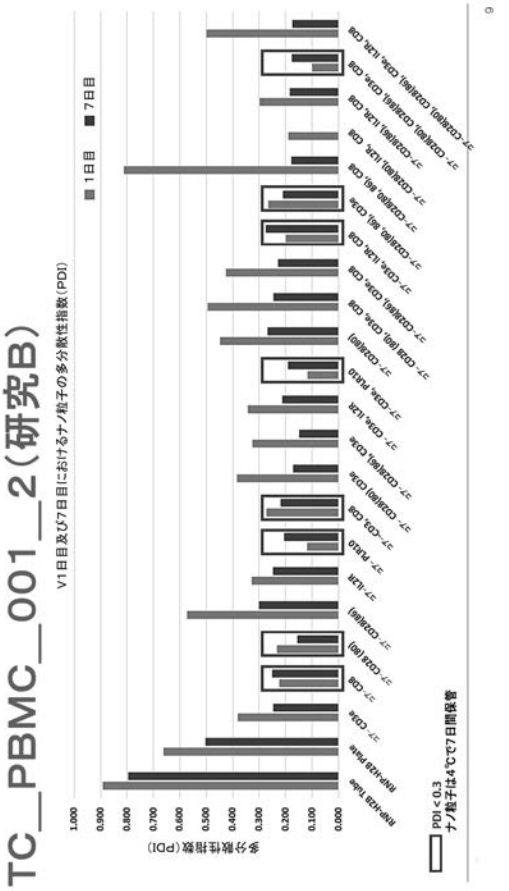


Figure 18

【図１９】

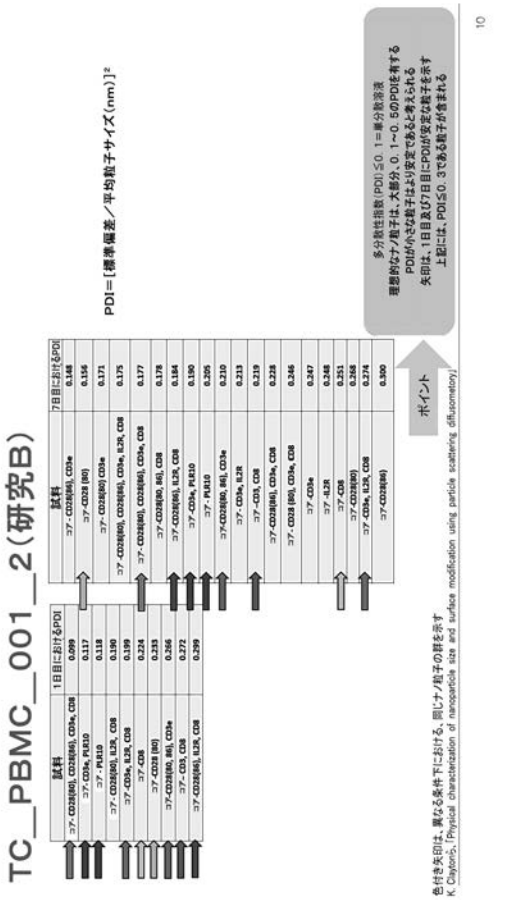


Figure 19

【図２０】

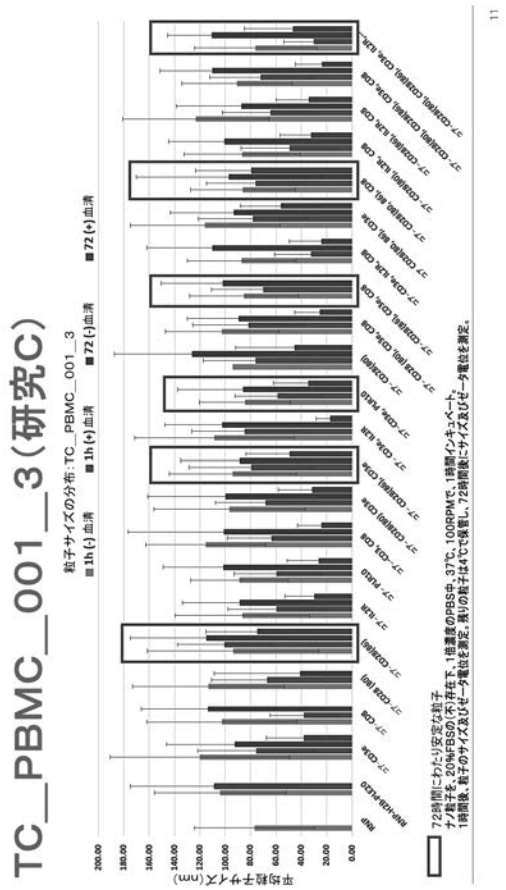


Figure 20

【図２１】

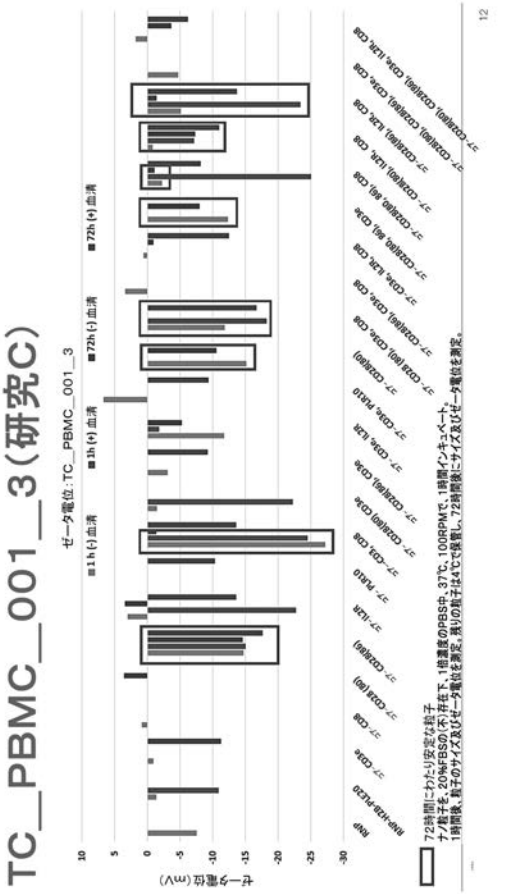


Figure 21

【図２２】

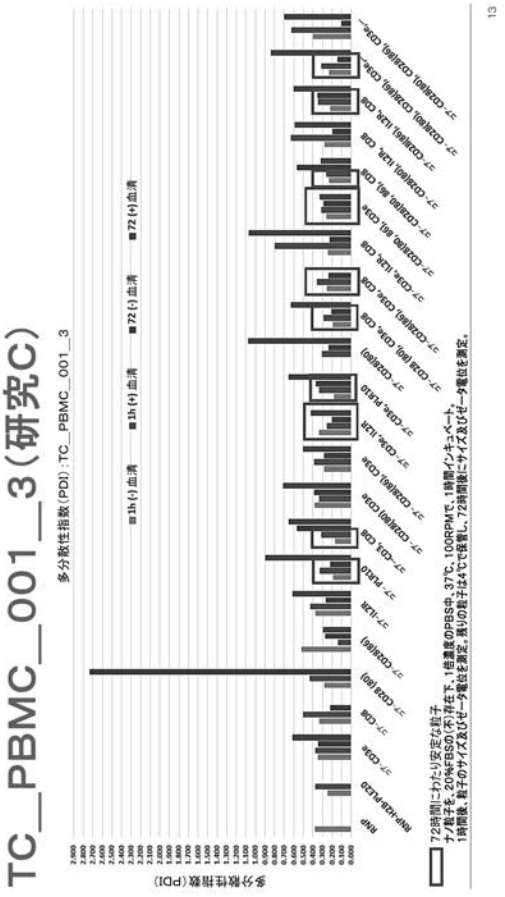


Figure 22

【図２３】

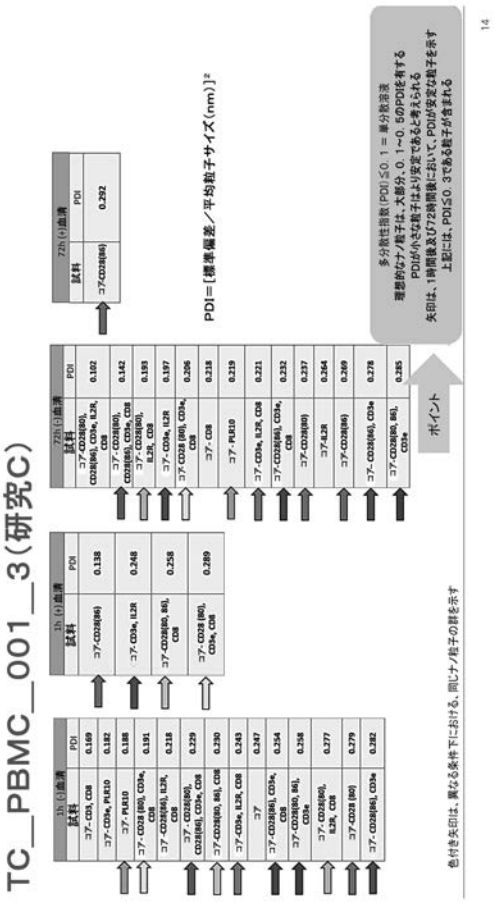


Figure 23

【図２４】

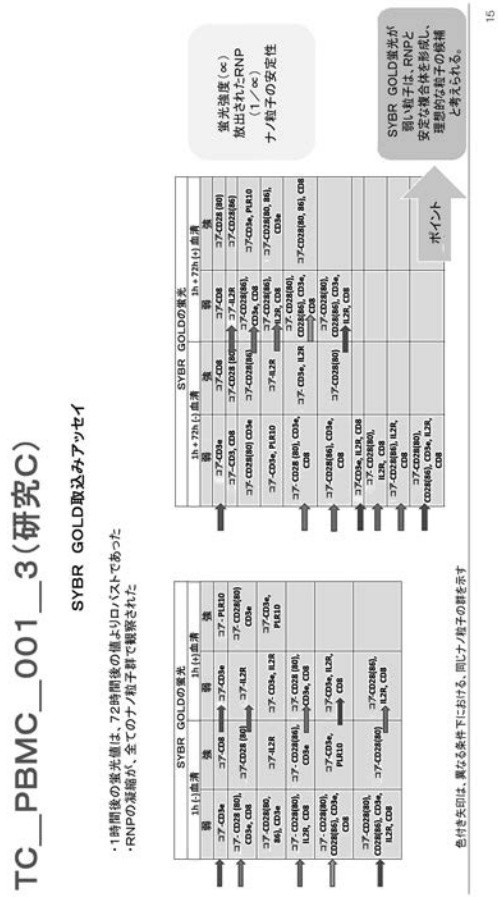


Figure 24

【図２５】

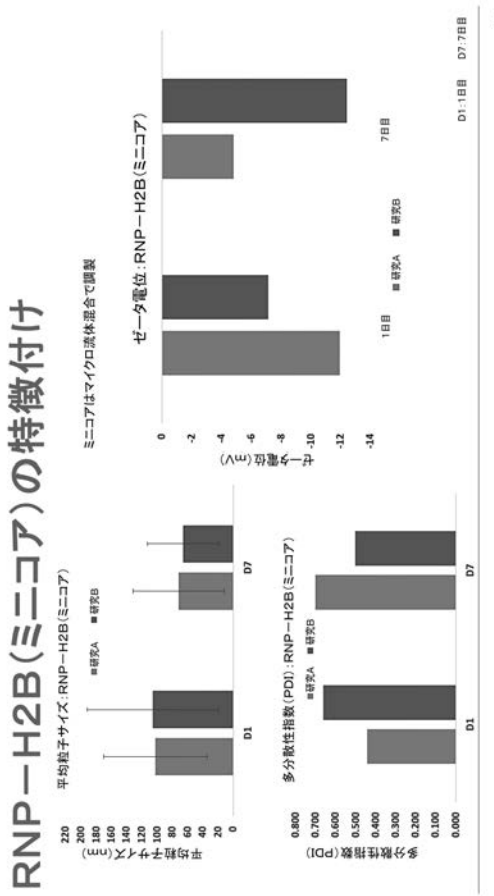


Figure 25

【図２６】

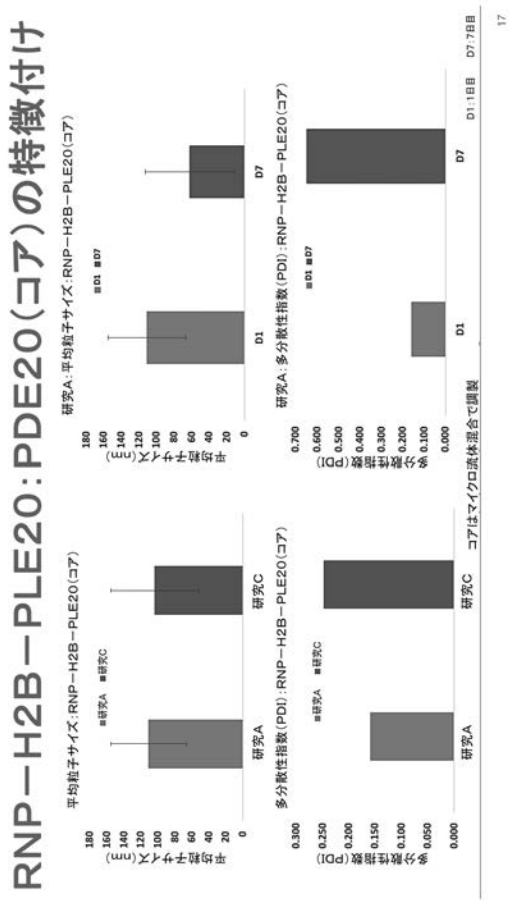


Figure 26

【図２７】

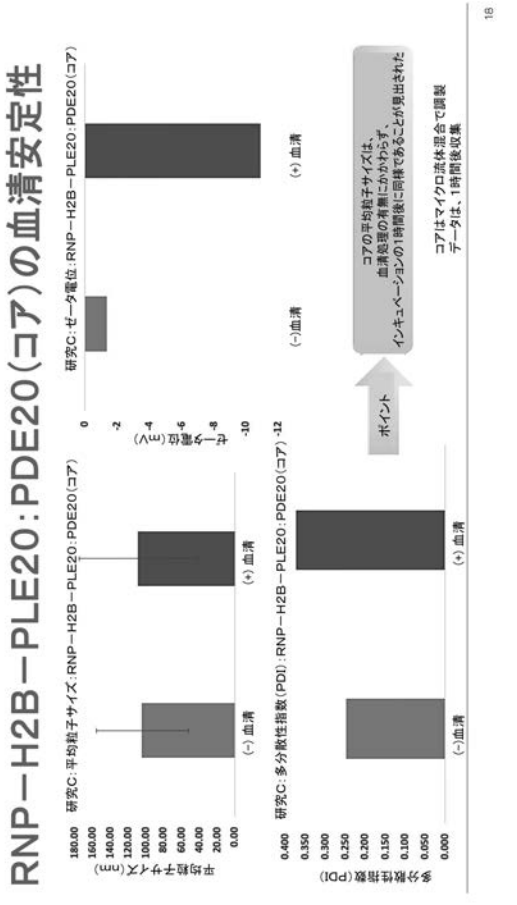


Figure 27

【図２８】



Figure 28

【図２９】

Figure 29

【図３０】

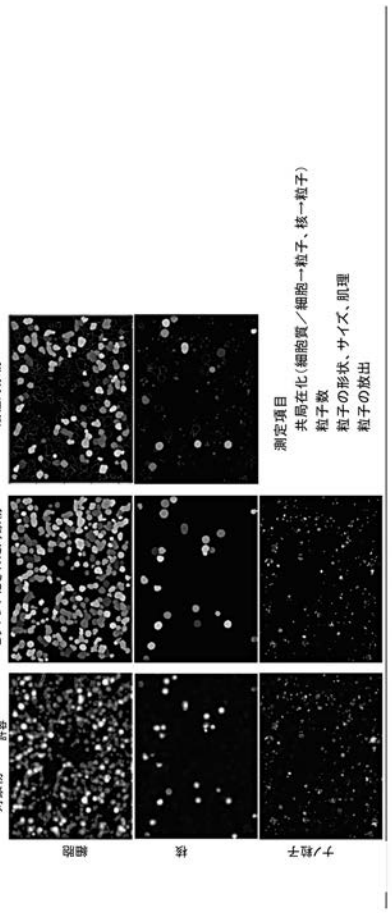


Figure 30

【図３１】



Figure 31

【図３２】

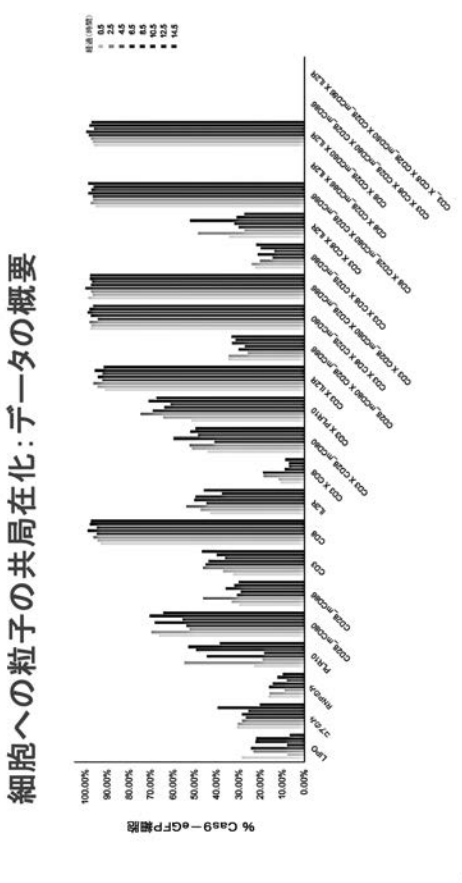


Figure 32

【図３３】



Figure 33

【図３４】

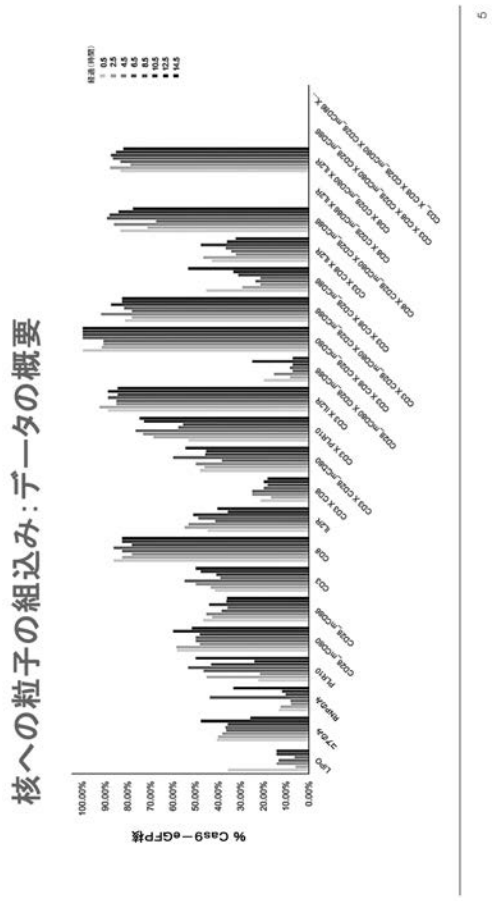
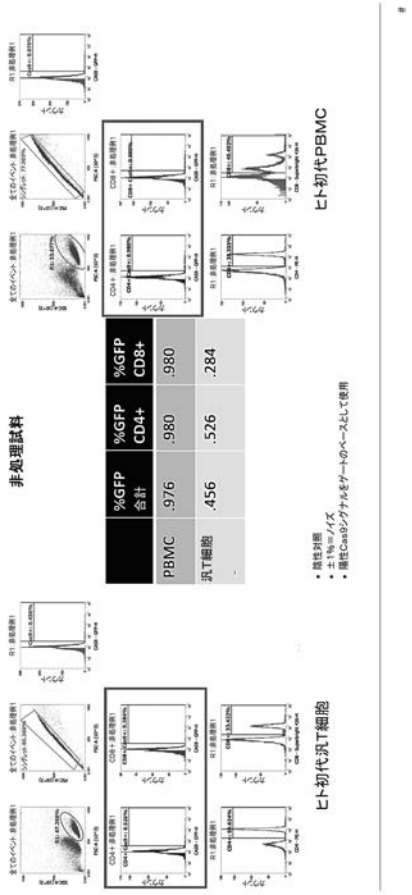


Figure 34

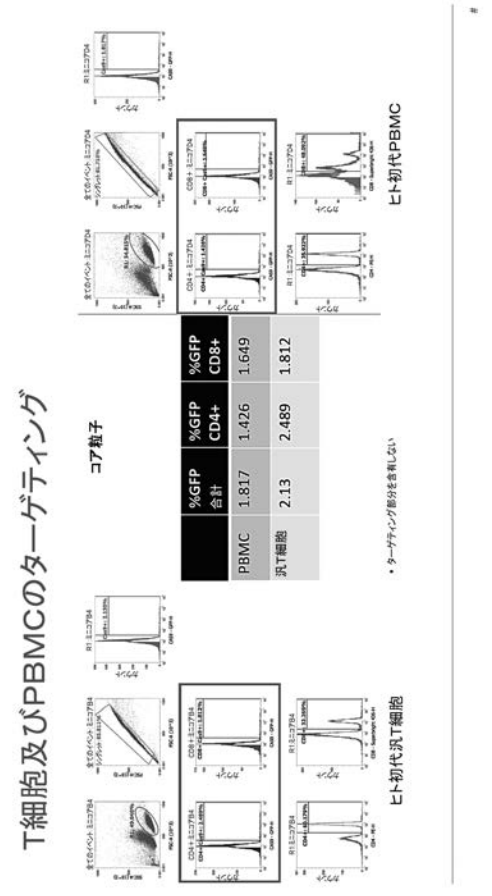
【図３５】



	%GFP 合計	%GFP CD4+	%GFP CD8+
PBMC	.976	.980	.980
汎T細胞	.456	.526	.284

Figure 35

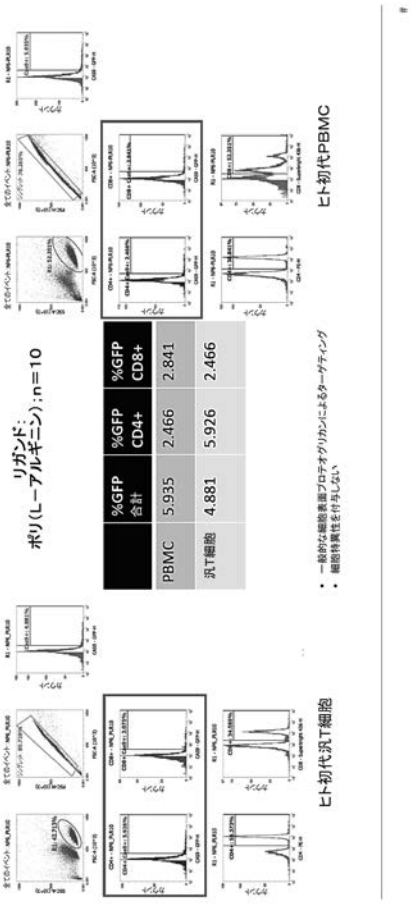
【図３６】



	%GFP 合計	%GFP CD4+	%GFP CD8+
PBMC	1.817	1.426	1.649
汎T細胞	2.13	2.489	1.812

Figure 36

【図３７】



	%GFP 合計	%GFP CD4+	%GFP CD8+
PBMC	5.935	2.466	2.841
汎T細胞	4.881	5.926	2.466

Figure 37

【図３８】

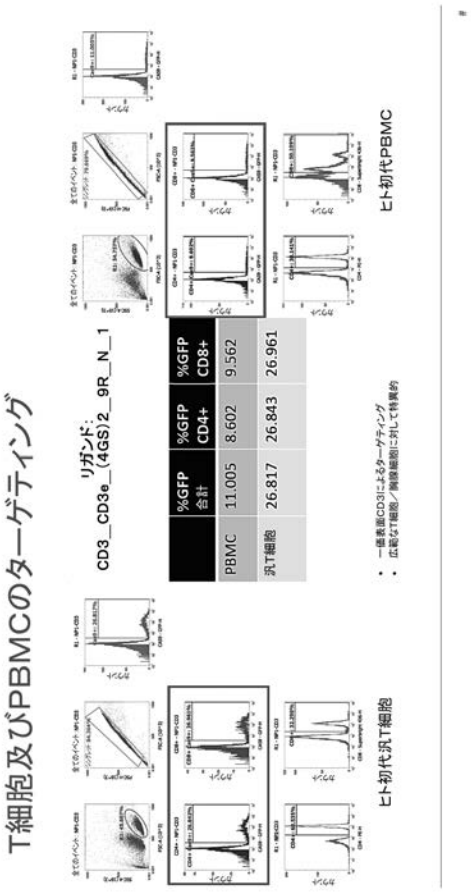


Figure 38

【図３９】

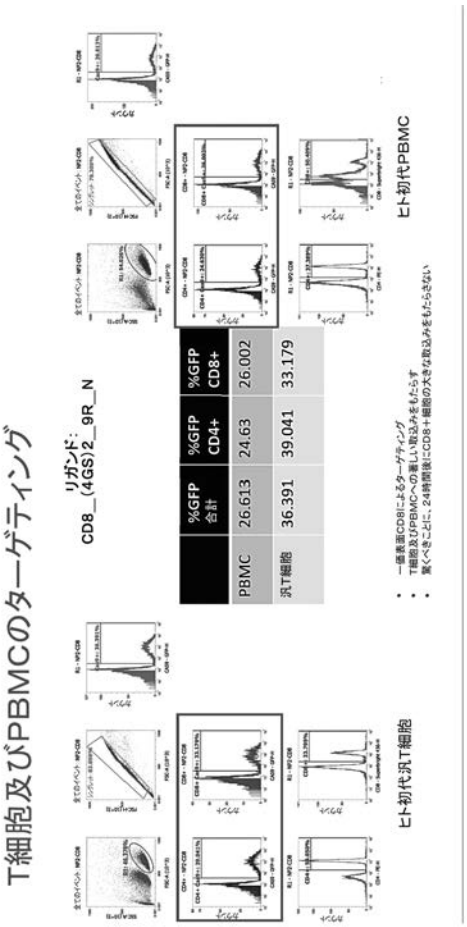


Figure 39

【図４０】

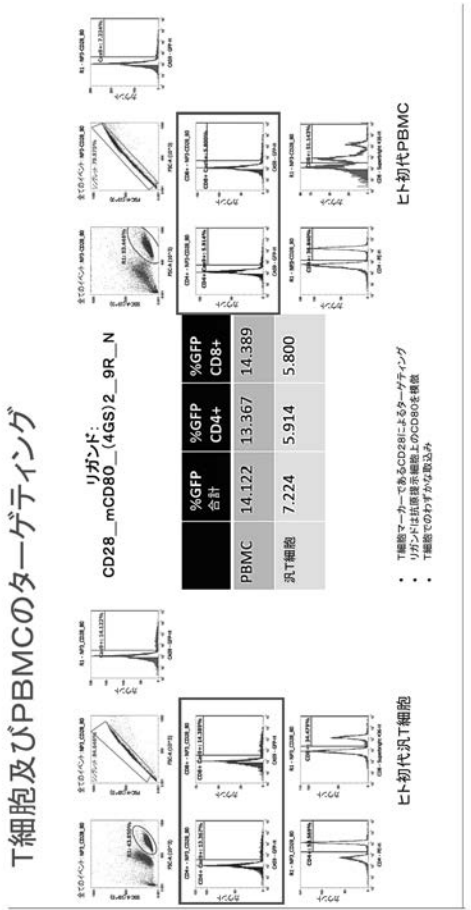


Figure 40

【図４１】

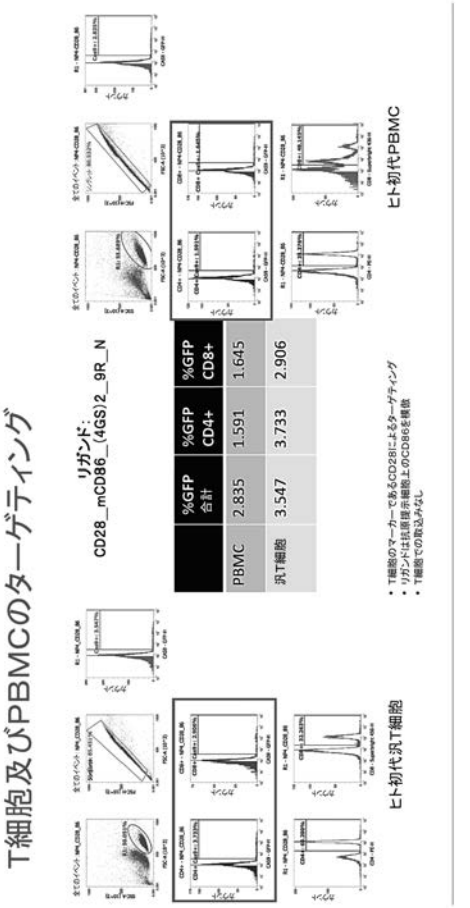
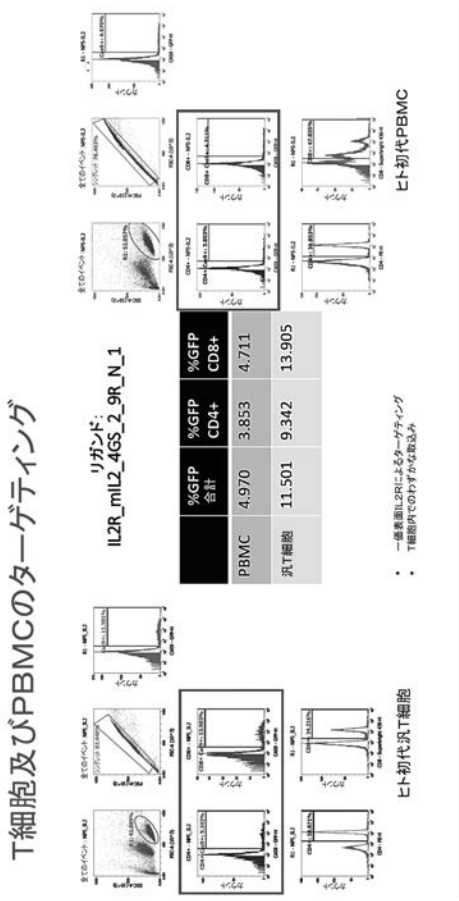


Figure 41

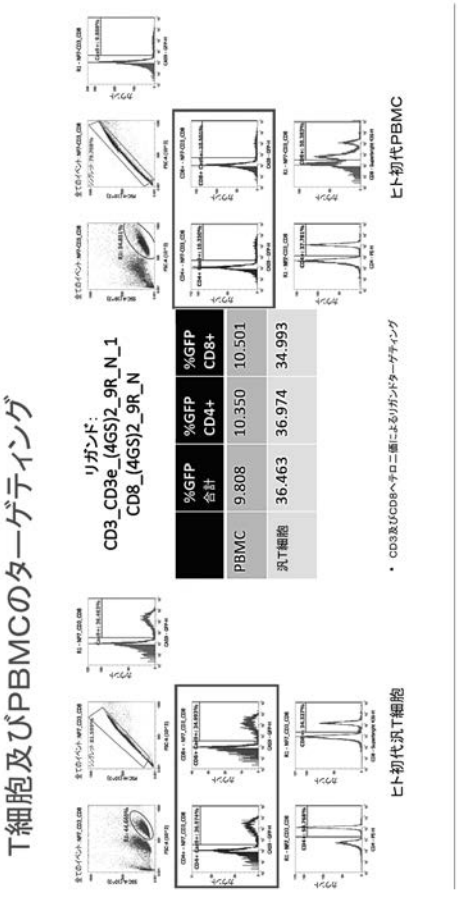
【図４２】



	%GFP 合計	%GFP CD4+	%GFP CD8+
PBMC	4.970	3.853	4.711
汎T細胞	11.501	9.342	13.905

Figure 42

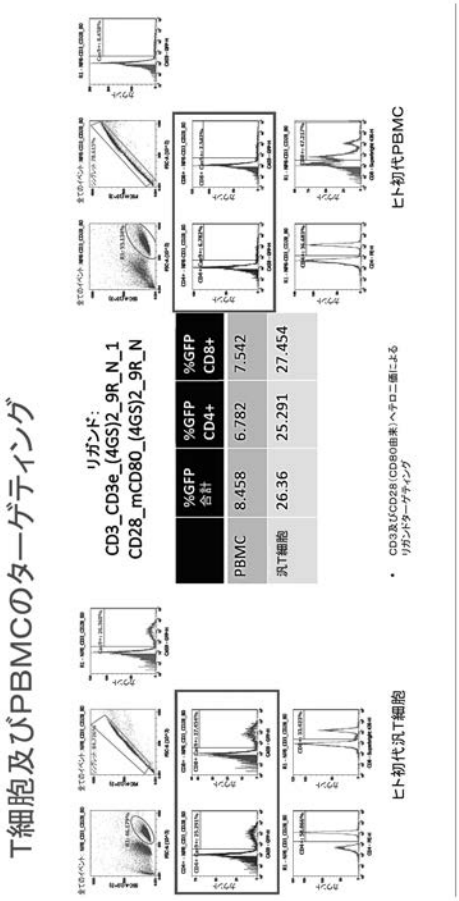
【図４３】



	%GFP 合計	%GFP CD4+	%GFP CD8+
PBMC	9.808	10.350	10.501
汎T細胞	36.463	36.974	34.993

Figure 43

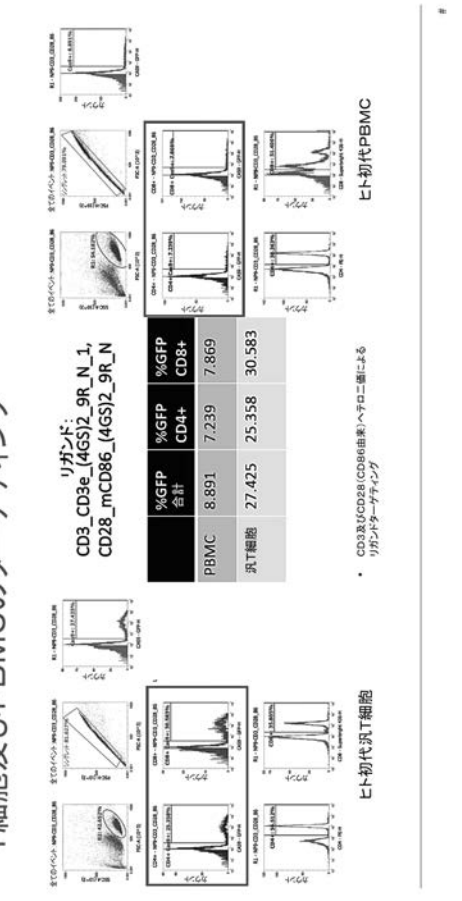
【図４４】



	%GFP 合計	%GFP CD4+	%GFP CD8+
PBMC	8.458	6.782	7.542
汎T細胞	26.36	25.291	27.454

Figure 44

【図４５】



	%GFP 合計	%GFP CD4+	%GFP CD8+
PBMC	8.891	7.239	7.869
汎T細胞	27.425	25.358	30.583

Figure 45

【図４６】

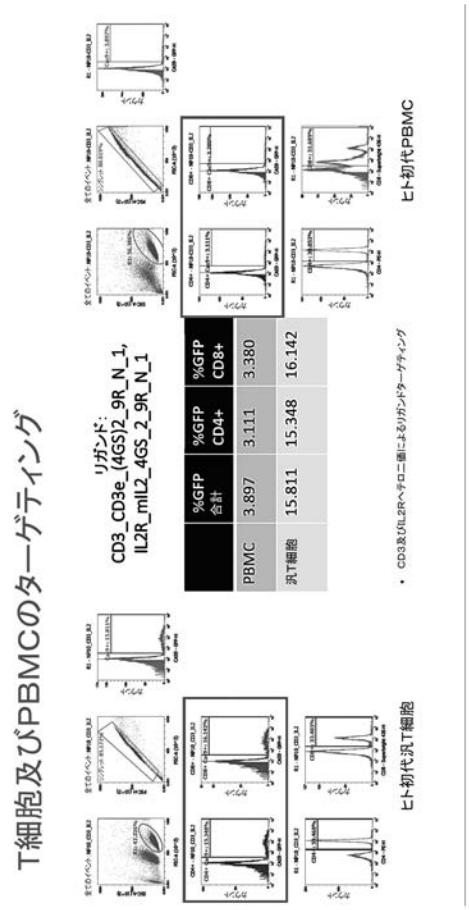


Figure 46

【図４７】

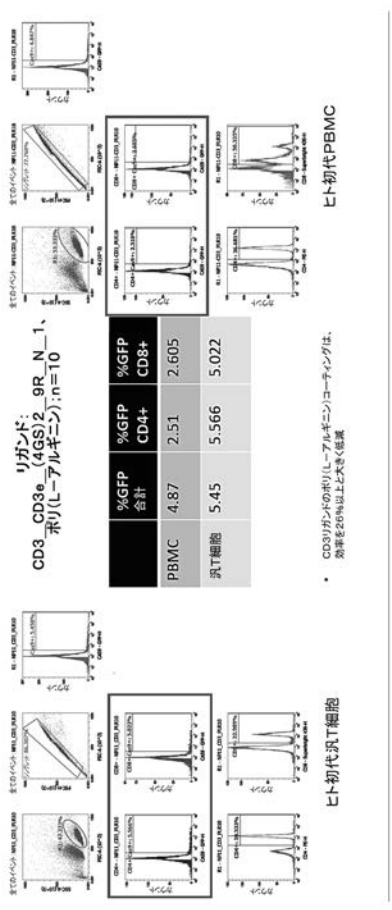


Figure 47

【図４８】

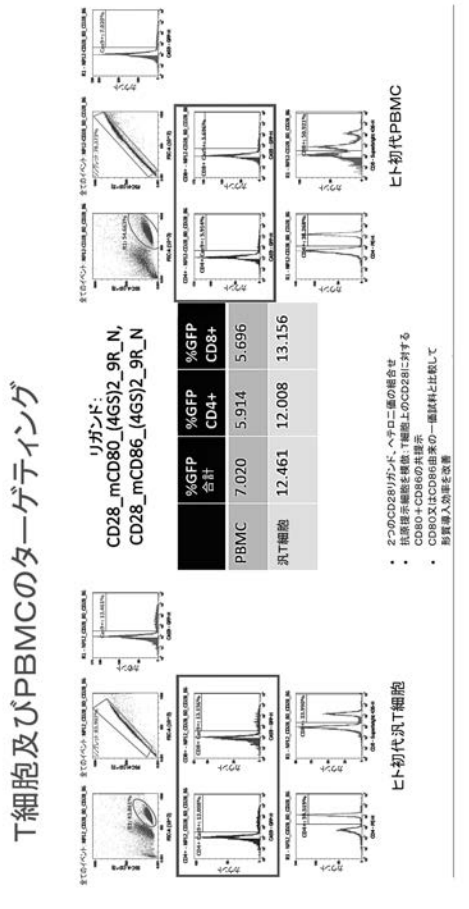


Figure 48

【図４９】

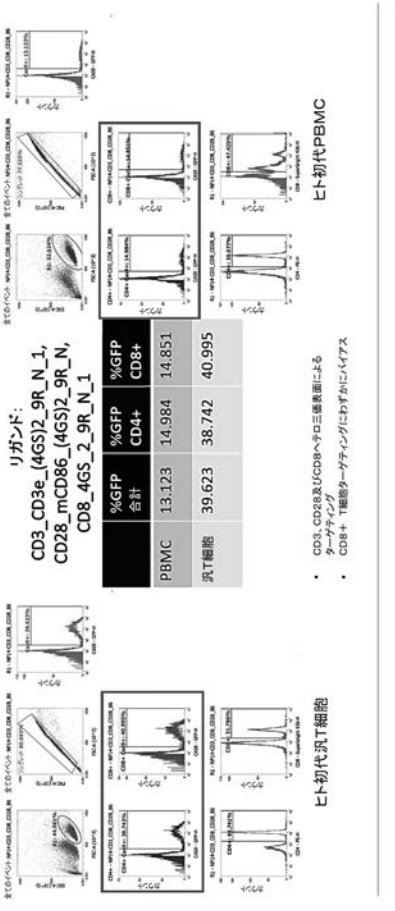


Figure 49

【図５０】

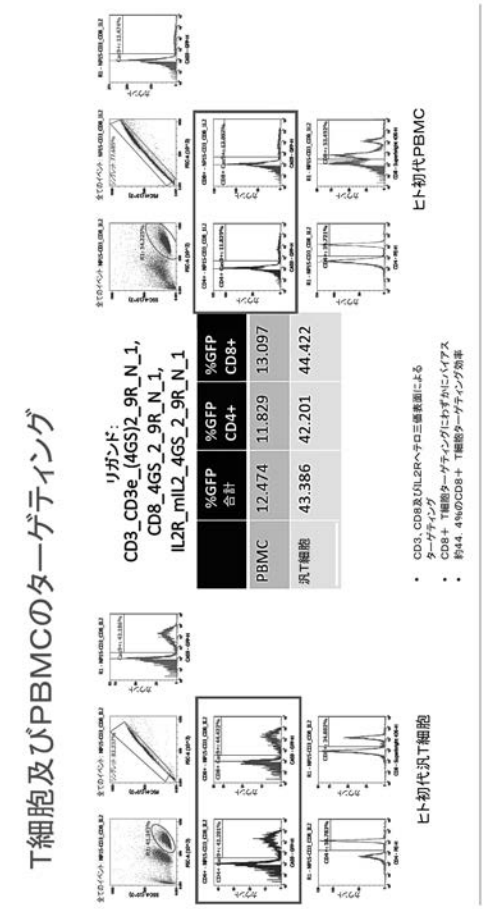


Figure 52

【図５１】

Figure 50

【図５２】

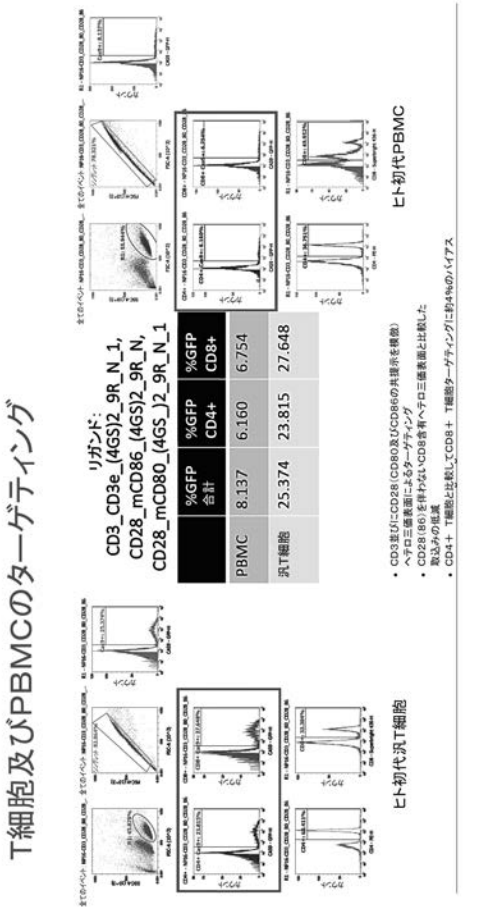


Figure 52

【図５３】

Figure 53

【図５４】

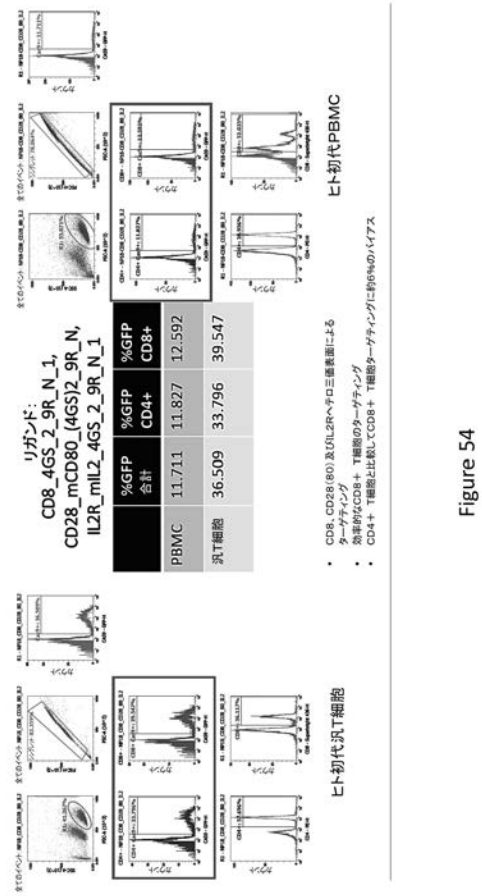


Figure 54

【図５５】

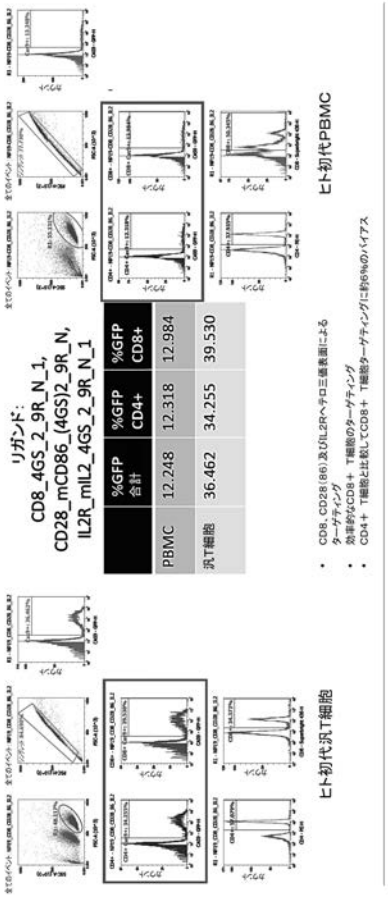


Figure 55

【図５６】

結果の続き

リガンド	画像解析(1時間後) %T細胞	%PBMC	汎T細胞のフロー解析(24時間後) %合計	%CD4	%CD8	PBMCのフロー解析(24時間後) %合計	%CD4	%CD8
非リガンド(L-アルギニン), n=10	92	26	**4.881**	5.926	2.466	**5.935**	2.466	2.841
CD3_CD3e_(4GS)2_9R_N_1	3	4	**26.817**	26.843	26.961	**11.005**	8.602	9.562
CD8_(4GS)2_9R_N	57	39	**36.391**	39.041	33.179	**26.613**	24.63	26.002
CD28_mCD80_(4GS)2_9R_N	60	3	**7.224**	5.914	5.800	**14.122**	13.367	14.389
CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N	11	11	**3.547**	3.733	2.906	**2.835**	1.591	1.645
IL2R_mIL2_4GS_2_9R_N_1	39	24	**11.501**	9.342	13.905	**4.970**	3.853	4.711
CD3_CD3e_(4GS)2_9R_N_1 CD8_(4GS)2_9R_N	63	37	**36.463**	36.974	34.993	**9.808**	10.350	10.501
CD3_CD3e_(4GS)2_9R_N_1 CD28_mCD80_(4GS)2_9R_N	25	23	**26.36**	25.291	27.454	**8.458**	6.782	7.542
CD3_CD3e_(4GS)2_9R_N_1, CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N	90	46	**27.425**	25.358	30.583	**8.891**	7.239	7.869
CD3_CD3e_(4GS)2_9R_N_1, IL2R_mIL2_4GS_2_9R_N_1	6	6	**15.811**	15.348	16.142	**3.897**	3.111	3.380
CD3_CD3e_(4GS)2_9R_N_1, 非リガンド(L-アルギニン), n=10	-	-	**5.45**	5.566	5.022	**4.87**	2.51	2.605

Figure 56

【図５７】

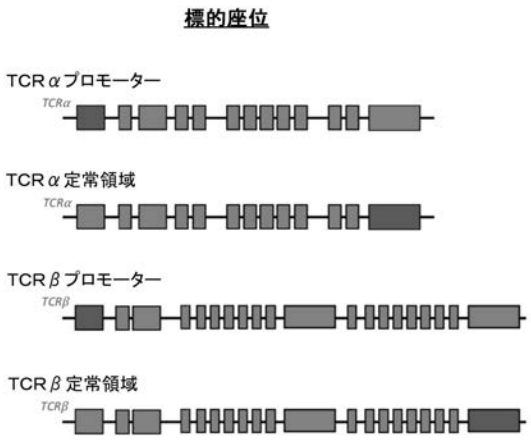
結果の続き

リガンド	画像解析(1時間後) %T細胞	%PBMC	汎T細胞のフロー解析(24時間後) %合計	%CD4	%CD8	PBMCのフロー解析(24時間後) %合計	%CD4	%CD8
CD28_mCD80_(4GS)2_9R_N, CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N	22	90	**12.461**	12.008	13.156	**7.020**	5.914	5.696
CD3_CD3e_(4GS)2_9R_N_1, CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N, CD8_4GS_2_9R_N_1	21	21	**39.623**	38.742	40.995	**13.123**	14.984	14.851
CD3_CD3e_(4GS)2_9R_N_1, CD8_4GS_2_9R_N_1, IL2R_mIL2_4GS_2_9R_N_1	11	21	**43.386**	42.201	44.422	**12.474**	11.829	13.097
CD3_CD3e_(4GS)2_9R_N_1, CD28_mCD80_(4GS)2_9R_N, CD8_4GS_2_9R_N_1	7	6	**41.285**	39.209	43.922	**13.476**	12.624	13.330
CD3_CD3e_(4GS)2_9R_N_1, CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N, CD28_mCD80_(4GS)_2_9R_N_1	35	36	**25.374**	23.815	27.648	**8.137**	6.160	6.754
CD8_4GS_2_9R_N_1, CD28_mCD80_(4GS)2_9R_N, CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N	39	21	**34.880**	32.262	38.440	**11.856**	12.082	12.792
CD8_4GS_2_9R_N_1, CD28_mCD80_(4GS)2_9R_N, IL2R_mIL2_4GS_2_9R_N_1	42	43	**36.509**	33.796	39.547	**11.711**	11.827	12.592
CD8_4GS_2_9R_N_1, CD28_mCD86_(4GS)2_9R_N, IL2R_mIL2_4GS_2_9R_N_1	27	27	**36.462**	34.255	39.530	**12.248**	12.318	12.984

Figure 57

【図５８】

Figure 58：TCR操作のための標的座位



【図５９】

Figure 59: TCR特異的ガイドRNA及びTALEN配列

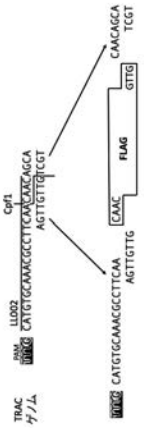
配列番号	配列	説明
1	CATGTGCAAACGCCTTCAACAACA	TRAC エクソン1 Cpf1 ガイド
2	cttctctatgtttccatgaagatg	TRAC プロモーター Cpf1 ガイド
3	GGTGTGGGAGATCTCTGCTTCTGA	TRAB エクソン1 Cpf1 ガイド
4	CAGATGGGCTGAAGTCTCCACTGT	TRAB プロモーター Cpf1 ガイド
5	gagaatcaaaatcggtgaat	TRAC エクソン1 Cas9 gRNA1
6	aacaaatgtgtcacaaagta	TRAC エクソン1 Cas9 gRNA2
7	GAGCCACTGTAGTCTGCAGA	TRA プロモーター Cas9 gRNA1
8	GGAACCGGGGATGCAGTGCC	TRA プロモーター Cas9 gRNA2
9	CAAACACAGCGACCTCGGGT	TRBC エクソン1 Cas9 gRNA1
10	AGAGATCTCCCACACCCAAA	TRBC エクソン1 Cas9 gRNA2
11	CCCTGAGACAGGGGCTGCTT	TRB プロモーター Cas9 gRNA1
12	GGAAGCACACCCAGACGACA	TRB プロモーター Cas9 gRNA2
13	TGCCGTGTACCAGCTGAGA	TRAC エクソン1 左 TALEN
14	TCGGTGAATAGGCAGACAG	TRAC エクソン1 右 TALEN
15	tggagatagggacctcac	TRAC プロモーター 左 TALEN
16	tgaggccaggaactggag	TRAC プロモーター 右 TALEN
17	TGAACAAGGTGTTCCCAC	TRAB エクソン1 左 TALEN
18	tctgcttctgatggctca	TRAB エクソン1 右 TALEN
19	TGTCTCAGGGCCAGGGAA	TRAB プロモーター 左 TALEN
20	TCCCTGCTCTGTGTCCTT	TRAB プロモーター 右 TALEN
21	agtcacccaagtgtggtctaatataaatcctgtgttcctgaggtca tgcagattgagagaggaagtgatgtcactgtgggaacttccgtgt aaggacgggggcgtcccctcctcctctgctcctgctcacagtgatcct gatctggtaagagctcccatcctgccctgaccctgcc	リガンドとなる147bpのTCRβプロモーター

【図６０】

Figure 60

Cpf1＋tetrisDNAによるTCRゲノム操作

Cpf1 sgRNA	ガイド配列	標的座位	ssDNA 1	ssDNA 2
LL002	CATGTGCAAACGCCTTCAAC	TRAC	GTTGcttatctgtcatcgtcttttgtaatc	CAACgattacaaagacgatgacgataag
LL003	GGTGTGGGAGATCTCTGCTTCTGA	TRBC1及び TRBC2	TCTGcttatctgtcatcgtcttttgtaatc	CAGAgattacaaagacgatgacgataag
LL032	TTTGAGAATCAAAATCGGTG	TRAC	GAATcttatctgtcatcgtcttttgtaatc	ATTCgattacaaagacgatgacgataag



【図６１】

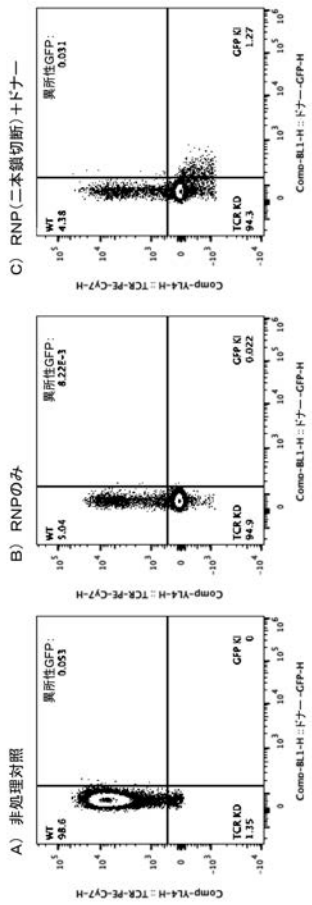


Figure 61

【図６２】

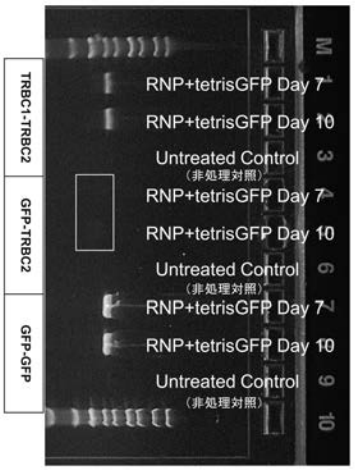


Figure 62

【図６３】

プライマー：	TRBC1-TRBC2			GFP-TRBC2				GFP-GFP		
	欠失			ノックイン				ドナーGFP		
レーン：	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
TRBC1－TRBC2又はGFP－GFP	+	+	-	-	-	-	+	+	-	
GFP-TRBC2	-	-	-	+	+	-	-	-	-	

Figure 63

【図６４】

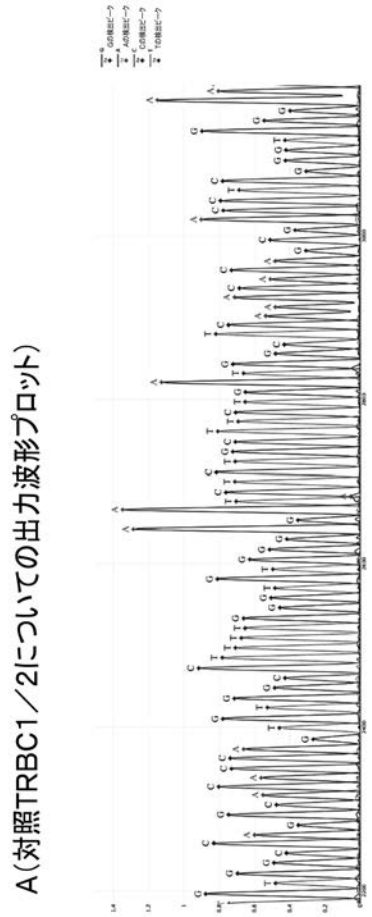


Figure 64

【図６５】

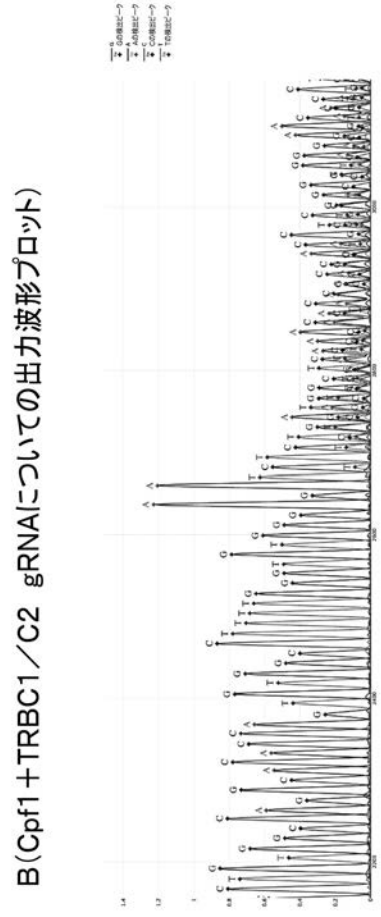


Figure 65

【図６６】

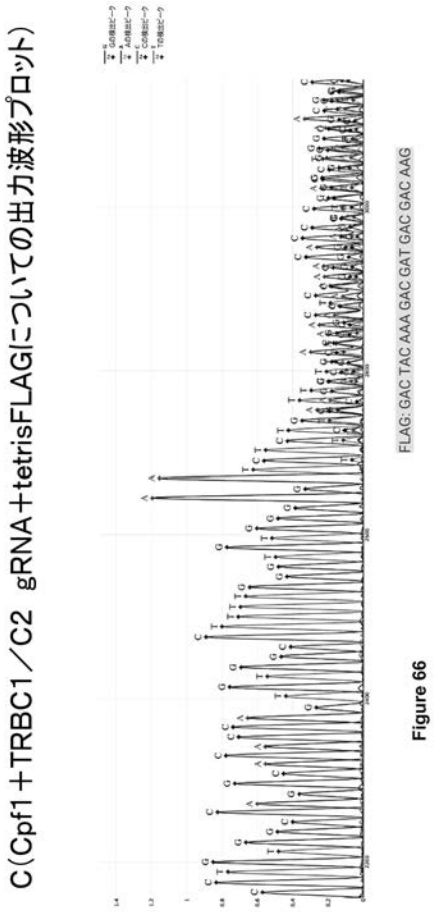


Figure 66

【配列表】

2021521884000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US19/28004

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - C12N 15/09, 15/10, 15/64, 15/66, 15/90 (2019.01)

CPC - C12N 15/09, 15/10, 15/64, 15/66, 15/90

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -- Y	WO 2018/013990 A1 (ZYMERGEN INC.) 18 January 2018; paragraphs [0002], [0027], [0046], [0096], [0115], [0149], [0152]	1-2, 3/1-2, 66 --- 67, 69/67
Y	US 2016/0230189 A1 (RENSSELAER POLYTECHNIC INSTITUTE) 11 August 2016; paragraphs [0006], [0027], [0056], [0057]	67, 69/67
A	(LEE, K et al.) Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleoprotein and donor DNA in vivo induces homology-directed DNA repair. Nature Biomedical Engineering, 2 October 2017, Vol. 1; pages 889-901; page 3, 2nd paragraph, 3rd paragraph; DOI: 10.1038/s41551-017-0137-2	68, 69/68
A	US 2018/0002708 A1 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 4 January 2018; entire document	1
A	WO 2018/064226 A1 (UBIOME, INC.) 5 April 2018; entire document	1

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 July 2019 (19.07.2019)	01 AUG 2019
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US19/28004

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 4-65 and 70-79
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
C07K	*14/50*	*(2006.01)*	C07K	14/50		
C07K	*16/00*	*(2006.01)*	C07K	16/00		
C12N	*15/13*	*(2006.01)*	C12N	15/13		
C12N	*15/62*	*(2006.01)*	C12N	15/62	Z	
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/10		

(31)優先権主張番号 62/736,400
(32)優先日 平成30年9月25日(2018.9.25)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(74)代理人 100153051
弁理士 河野 直樹
(74)代理人 100162570
弁理士 金子 早苗
(72)発明者 ワトソン、アンドレ・ロナルド
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 ９４１０７、サンフランシスコ、イリノイ・ストリート ７００、ユニット ２０４
(72)発明者 フォスター、クリスティアン
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 ９４６０７、オークランド、キャンベル・ストリート １１２３
(72)発明者 リン、シュアイリャン
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 ９４１０７、サンフランシスコ、フィフス・ストリート ６５０、スイート ３１１
(72)発明者 ペイロー、サラ・マリー
アメリカ合衆国、カリフォルニア州 ９４７０３、バークレー、シックスティサード・ストリート １７０４、アパートメント・エイチ

Fターム(参考) 4B065 AA90X AA90Y AA93X AA93Y AB01 AC14 CA24 CA25
4H045 AA10 AA30 BA41 CA40 DA50 DA76 EA60 FA74